

---

**Vergleich der Interaktion von naiven T-Zellen mit  
verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen und die  
Rolle von CYTIP bei antigenspezifischen Interaktionen  
in Dendritischen Zellen**

---

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte

DISSERTATION

**von Bastian Dornbach  
aus Goslar**

1. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland

2. Referent: Prof. Dr. Matthias Gunzer

eingereicht am: 04.02.2008

mündliche Prüfung (Disputation) am: 16.04.2008

Druckjahr 2008

## Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

## Publikationen

1. Reichardt P., **Dornbach B.**, Gunzer M. The molecular makeup and function of regulatory and effector synapses. **Immunol Rev.** 2007 Aug; 218:165-77. Review.
2. Reichardt P., **Dornbach B.**, Gunzer M. Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunological synapse. **Blood.** 2007 Sep 1;110(5):1519-29.
3. **Dornbach B.**, Gunzer M. Imaging of immune cells – in vitro veritas? **G.I.T. Imaging & Microscopy** 3/2006

## Tagungsbeiträge

1. **Dornbach B.**, Wehland J., Schilling M., Kliche S., Stradal T.E.B., Gunzer M. Dissecting the cytoskeletal organization and immune synapse structure in interactions between T cells and different antigen presenting cells. **Satellitensymposium des Arbeitskreises „Adhäsionsmoleküle“ der Deutschen Gesellschaft für Immunologie** in Kiel (Deutschland, 2005); Kurzvortrag
2. **Dornbach B.**, Stradal T.E.B., Gunzer M. The cytoskeletal organization and immune synapse structure in interactions between T cells and different antigen presenting cells. **Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie** in Braunschweig (Deutschland, 2006); Posterpräsentation
3. **Dornbach B.**, Gunzer M. Interactions of T cells with antigen presenting cells: The immunological synapse as a communication platform. **Interdisziplinärer Workshop „Communication“ der Doktorandenvertretung**

**PhD-net der Max-Planck-Gesellschaft** in Frankfurt (Deutschland, 2007):  
Posterpräsentation

4. **Dornbach B.**, Wehland J., Kliche S., Stradal T.B.E., Gunzer M. Molecular mechanisms governing the structure of immunological synapses between T cells and different antigen presenting cells. **Satellitensymposium des Arbeitskreises „Adhäsionsmoleküle“ der Deutschen Gesellschaft für Immunologie** in Heidelberg (Deutschland, 2007); Kurzvortrag
5. **Dornbach B.**, Gunzer M. Eine Immunzelle, viele Antworten und die Frage: „Wie unterhält sich das Immunsystem?“ **WissensWerte – Bremer Forum für Wissenschaftsjournalismus** in Bremen (Deutschland, 2007); Posterpräsentation



**Meinem Großvater Christoph Dornbach gewidmet**

**Die Wahrheit ist der Beweisbarkeit überlegen.**

Kurt Gödel (1906-1978)

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS.....</b>	<b>1</b>
<b>2 EINLEITUNG .....</b>	<b>5</b>
2.1 DAS IMMUNSYSTEM .....	5
2.2 DIE IMMUNOLOGISCHE SYNAPSE .....	13
2.3 DAS ZYTOSKELETT .....	19
2.4 DAS INTEGRIN LFA-1 UND DIE IMMUNOLOGISCHE SYNAPSE .....	26
2.5 RASTERKRAFTMIKROSKOPIE .....	29
2.6 ZIEL DER ARBEIT.....	31
<b>3 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>32</b>
3.1 ZELLKULTUR-MATERIAL .....	32
3.2 CHEMIKALIEN UND ZUSÄTZE.....	32
3.3 MEDIEN UND PUFFER.....	32
3.4 MÄUSE .....	36
3.5 ISOLIERUNG VON LYMPHOZYTEN-POPULATIONEN AUS DER MILZ.....	36
3.6 GENERIERUNG VON DENDRITISCHEN ZELLEN AUS DEM KNOCHENMARK .....	37
3.7 AKTIVIERUNG VON NAIVEN IMMUNZELLEN <i>IN VITRO</i> .....	38
3.8 INTERAKTION VON T-ZELLEN MIT ANTIGENPRÄSENTIERENDEN ZELLEN .....	39
3.9 ANTIKÖRPER UND IMMUNFLUORESCENZEN.....	39
3.10 FÄRBen VON LYMPHOZYTEN MIT CARBOXYFLUORESZEIN DIAZETAT, SUCCINIMIDYL ESTER (CFSE) .....	42
3.11 PROLIFERATIONSASSAY UND INHIBITIONSASSAY .....	42
3.12 PROTEIN-KNOCKDOWN IN DCs MITTELS RNAi.....	43
3.13 HERSTELLEN VON ZELL-LYSATEN.....	44
3.14 PROTEINDETEKTION IM WESTERN BLOT .....	45
3.15 KOMPETITIVER T-ZELL-AKTIVIERUNGSASSAY .....	45
3.16 MESSUNG VON ANTIGENSPEZIFISCHEN INTERAKTIONSKRÄFTEN MITTELS KRAFTSPEKTROSKOPIE.....	46

<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>51</b>
4.1	FORMATION EINER IMMUNOLOGISCHEN SYNAPSE BEI DER INTERAKTION VON NAIVEN T-ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN ANTIGENPRÄSENTIERENDEN ZELLEN .....	51
4.2	DIE STRUKTUR DES ZYTOSKELETTS BEI INTERAKTIONEN VON T-ZELLEN MIT VERSCHIEDENEN ANTIGENPRÄSENTIERENDEN ZELLEN .....	57
4.3	EFFEKTE VON CYTIP-SIRNA IN DCs AUF DIE INTERAKTION UND AKTIVIERUNG VON NAIVEN T-ZELLEN .....	63
4.4	KRAFTSPEKTROSKOPIE VON ANTIGENSPEZIFISCHEN INTERAKTIONEN.....	73
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>79</b>
5.1	DIE IMMUNOLOGISCHE SYNAPSE UND DIE ROLLE DER ANTIGEN- PRÄSENTIERENDEN ZELLE .....	79
5.2	DAS ZYTOSKELETT IN T-ZELLEN UND ANTIGENPRÄSENTIERENDEN ZELLEN .....	82
5.3	DIE ROLLE VON CYTIP IN DCs WÄHREND DER INTERAKTION MIT NAIVEN T-ZELLEN .....	86
5.4	KRAFTSPEKTROSKOPIE VON ANTIGENSPEZIFISCHEN INTERAKTIONEN.....	89
5.5	AUSBLICK .....	91
<b>6</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>92</b>
<b>7</b>	<b>REFERENZEN</b>	<b>94</b>
	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>105</b>
	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>107</b>
	<b>CURRICULUM VITAE</b>	<b>108</b>

Der Arbeit ist eine Daten-CD beigelegt, auf welcher in einer PowerPoint-Präsentation sämtliche in der Arbeit verwendeten Immunfluoreszenz-Abbildungen gezeigt werden. Zusätzlich sind dort die zu den Abbildungen 4.16 und 4.17 gehörenden Filme im .avi-Format sowie eine Animation der Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Abb. 4.20A zu finden.

# 1 Zusammenfassung

T-Zellen benötigen für ihre antigenspezifische Aktivierung den physikalischen Kontakt zu einer antigenpräsentierenden Zelle (APC), welche eine Dendritische Zelle (DC) oder eine B-Zelle sein kann. In Abhängigkeit der APC werden hierbei die T-Zellen unterschiedlich stark aktiviert und die Interaktionen der T-Zelle mit der APC erscheinen höchst different. Während die Kontakte von T-Zellen mit naiven B-Zellen sehr stabil sind, dabei aber eine sehr dynamische T-Zell-Migration induzieren, erscheinen Kontakte mit DCs als sequenzielle, kurze Ereignisse (Mempel et al., 2004; Henrickson and von Andrian, 2007; Gunzer et al., 2000). Dennoch werden T-Zellen durch DCs sehr viel stärker aktiviert (definiert als stark proliferierend) als dies bei Aktivierung durch naive B-Zellen der Fall ist.

In der vorliegenden Arbeit wurden Unterschiede untersucht, welche in den Interaktionen von naiven T-Zellen mit verschiedenen APCs vorliegen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass es zwischen naiven T- und B-Zellen innerhalb der Kontaktfläche der Zellen zur Bildung einer klassischen Immunologischen Synapse (IS) kam, einer Ansammlung von Signal- und Adhäsionsmolekülen. Diese Bildung war abhängig von der Antigenbeladung der B-Zelle und konnte in Interaktionen von T-Zellen mit aktivierten B-Zellen oder DCs nicht gefunden werden. Gleichzeitig konnten Unterschiede in der Verteilung des Aktin-Zytoskelettprotein-Komplexes ARP2/3 und der Polarisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts durch Reorientierung des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (MTOC) gezeigt werden. T-Zellen zeigten in Interaktionen mit naiven B-Zellen eine Bipolarisierung des ARP2/3-Komplexes sowohl an der Kontaktfläche als auch am Uropod der elongierten T-Zellen. Diese Bipolarisierung konnte in Interaktionen mit aktivierten B-Zellen und DCs nicht gefunden werden. Außerdem wurde die Reorientierung des MTOCs der T-Zelle zur Kontaktfläche bei allen drei Interaktionstypen gefunden, sowie bei naiven und aktivierten B-Zellen, während bei DCs als einzigen APCs eine solche Polarisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts nicht vorhanden war.

Interaktionen von T-Zellen mit naiven B-Zellen sind in hohem Maße abhängig von dem Integrin  $\alpha_L\beta_2$  (LFA-1), wohingegen Kontakte mit DCs von diesem Integrin unabhängig sind. Die Aktivierung von LFA-1 erfolgt über verschiedene Mechanismen, unter anderem durch Bindung des Proteins Cytohesin-1 an die  $\beta_2$ -Untereinheit. CYTIP, das

Cytohesin-interagierende Protein, greift in die Cytohesin-abhängige LFA-1-Aktivierung durch Translokation von Cytohesin-1 in das Zytoplasma ein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass ein Proteinknockdown von CYTIP in DCs mittels siRNA-Technik zu einer erhöhten Formation der IS in Interaktionen mit naiven T-Zellen führt. Gleichzeitig wurden die Interaktionszeiten länger. Dennoch konnte keine Veränderung in der Fähigkeit der DCs, T-Zellen zu aktivieren gemessen werden. Die Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD62L und CD69 war analog zu der durch Kontroll-DCs-aktivierten T-Zellen. Außerdem differenzierten diese T-Zellen entsprechend zu T-Effektorzellen, die die Aktivierung frischer naiver T-Zellen nicht störten. Die behandelten DCs waren überdies in der Lage, in Konkurrenz mit Kontroll-DCs und der Mischung von beladenen und unbeladenen DCs (Kontroll- wie CYTIP-siRNA-DCs), T-Zellen zu aktivieren, so dass der CYTIP-Knockdown keine messbare Benachteiligung der Fähigkeit von DCs zur T-Zellaktivierung zu Folge hatte.

Zusammengenommen zeigen diese Daten, dass die Bildung einer IS durch die APC gesteuert wird. Hierbei spielt die LFA-1-vermittelte Adhäsion des T-Zell-APC-Kontakts eine zentrale Rolle. Die naive T-Zelle zeigt dabei in Kontakten mit verschiedenen APCs eine unterschiedliche Verteilung von Signal- und Zytoskelettproteinen. Schließlich führt eine Verstärkung der Adhäsion in T-Zell-DC-Interaktionen zu keiner messbaren Veränderung der T-Zellaktivierung durch die DC.

## 2 Einleitung

### 2.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein komplexes System, welches die Aufgabe hat, den Wirtsorganismus vor körperfremden Substanzen wie Mikroorganismen zu schützen und diese zu beseitigen. Man unterscheidet hier zwischen der angeborenen Immunantwort, welche eine erste, unspezifische Verteidigungslinie gegen den Eintritt von Mikroorganismen bildet und der adaptiven Immunantwort, welche eine spezifisch auf das vorhandene Antigen ausgerichtete Abwehr durchführt. Dabei kommt es zu einer wechselseitigen Beeinflussung verschiedener Zelltypen mit Effektormechanismen, welche im Wesentlichen in zwei Kategorien zusammengefasst werden können: in die humorale, antikörpervermittelte Immunität und die zellvermittelte Immunität.

Organphysiologisch besteht das Immunsystem aus primären und sekundären lymphatischen Organen. Knochenmark und Thymus bilden die primären lymphatischen Organe, in denen immunkompetente Zellen entstehen. Sekundäre lymphatische Organe stellen Milz, Lymphknoten, Tonsillen (Mandeln) und die Peyerschen Platten des Intestinums (Darm) dar, in denen adaptive Immunantworten ausgelöst werden.

#### 2.1.1 Die angeborene Immunantwort

Die angeborene Immunität bildet die erste Verteidigungslinie, auf welche in den Körper eindringende Krankheitserreger (Pathogene) oder andere körperfremde Substanzen treffen. Oberflächenepithelien bilden eine mechanische, chemische und mikrobielle Barriere gegen Infektionen. Ein fester Zusammenhalt der Epithelzellen (Tight Junctions), Enzyme wie Lysozym in Speichel, Schweiß und Tränenflüssigkeit, antimikrobielle Peptide wie Defensine und die natürliche Mikroorganismenflora auf der Haut und Schleimhaut stellen den ersten Schutz vor einer Infektion durch pathogene Mikroorganismen dar.

Zelluläre Komponenten bilden Makrophagen, Granulozyten und Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen), welche mit ihren lytischen und phagozytierenden Fähigkeiten eingedrungene Mikroorganismen abtöten können. Zusätzlich verfügt die angeborene Immunität über ein System aus vielen verschiedenen Plasmaproteinen, wie den Akute-Phase-Proteinen und dem Komplementsystem. Proteine der Akuten-Phase, z.B. das C-

reaktive Protein oder das mannanbindende Lektin, imitieren die Wirkung von Antikörpern und binden spezifisch an Strukturen, die charakteristische Bestandteile von Bakterien sind. Dazu gehören bspw. bestimmte Formen von Phosphorylcholin oder Mannose, die in einem typischen Muster in der bakteriellen Zellwand angeordnet sind. Die Bindung von Akute-Phase-Proteinen fördert die Phagozytose durch Makrophagen und aktiviert das Komplementsystem, welches durch eine Kaskade von Reaktionen zu direkter Lyse von Krankheitskeimen führt oder ebenfalls die Phagozytose durch Makrophagen fördert (Degn et al., 2007; Du Clos and Mold, 2004; Kapetanovic and Cavaillon, 2007). Diese Mechanismen wirken innerhalb von Minuten und bieten einen effektiven Schutz gegen Infektionen; erst die Überwindung dieser Verteidigungsbarriere für Pathogene führt zur Auslösung einer adaptiven Immunantwort.

### 2.1.2 Die adaptive Immunantwort

Die adaptive Immunität richtet sich im Gegensatz zur angeborenen spezifisch gegen ein Antigen (= Antikörper generierend) und ist exakt auf dessen Struktur zugeschnitten. Die wichtigste Eigenschaft des adaptiven Immunsystems ist die Unterscheidung von körpereigenen und körperfremden Strukturen. Die zellulären Komponenten sind B- und T-Lymphozyten, deren Bezeichnung sich aus dem Ort ihrer Reifung herleitet (B historisch für die *Bursa fabricii* bei Vögeln; T für Thymus).

Die adaptive Immunantwort unterteilt sich in die T-Zell-vermittelte Immunität, bei der es zur Zerstörung einer infizierten Zielzelle kommt, und die humorale Immunantwort durch B-Zellen, die durch die Sekretion von Antikörpern (Immunglobulinen) charakterisiert ist. T-Zellen lassen sich funktionell in zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic T lymphocyte*, CTL), T-Helferzellen (Th-Zellen) und regulatorische T-Zellen (Treg-Zellen) unterscheiden. CTLs sind positiv für das Oberflächenmolekül „Differenzierungscluster 8“ (*cluster of differentiation*, CD8) und töten infizierte oder entartete Zielzellen durch Induktion des programmierten Zelltodes, der Apoptose, oder durch die Sekretion von Perforinen, welche die Membran zerstören (Janeway et al., 2002).

Th-Zellen sind positiv für den Oberflächenmarker CD4 und lassen sich in zwei Haupt-Unterklassen unterteilen: Th1-Zellen und Th2-Zellen. Diese beiden Zelltypen setzen nach Stimulierung unterschiedliche Zytokine und Chemokine frei, chemische Botenstoffe, welche bei Bindung an Rezeptoren der Zielzelle deren Differenzierung in verschiedene Richtungen bewirken. Th1-Zellen setzen nach erfolgter Aktivierung vor allem Interleukin-2 (IL-2), Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) und Tumor-Nekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) frei, wodurch die Teilung von T- und B-Zellen stimuliert wird, Makrophagen und NK-Zellen



aktiviert werden (zelluläre Immunität). Außerdem werden B-Zellen durch  $\text{IFN-}\gamma$  zum Klassenwechsel zu IgG2a angeregt. Im Gegensatz dazu setzen Th2-Zellen vor allem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 frei, was die Synthese von Antikörpern durch Förderung der Differenzierung von B-Zellen begünstigt. Gleichzeitig werden Th1-Zellen in ihrer Wirkung herunterreguliert, was die zelluläre Immunität hemmt und zu einer gesteigerten Antikörper-Antwort führt.

Seit kurzem wird eine neue Klasse von T-Helferzellen beschrieben, welche sich nicht in das Th1- und Th2-Schema eingliedern lassen, sog. Th17-Zellen. Diese Zellen sezernieren IL-17, IL-6 und  $\text{TNF-}\alpha$  (Harrington et al., 2006). Entscheidend für die Differenzierung dieser Zellen sind die Zytokine IL-6 und  $\text{TGF-}\beta$  (Mangan et al., 2006; Veldhoen et al., 2006). Dabei ist das von antigenpräsentierenden Zellen (APC) sezernierte Zytokin IL-23 wichtig für die Expansion und das Überleben dieser Zellen. Hingegen wird die Differenzierung von Th17-Zellen durch IL-4 und  $\text{IFN-}\gamma$  inhibiert. Th17-Zellen scheinen bei chronischen Entzündungsvorgängen beteiligt zu sein.

Treg-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Modulierung einer Immunantwort und bei der Aufrechterhaltung von Toleranz, z.B. gegenüber ungefährlichen körperfremden Substanzen. Regulatorische T-Zellen werden in natürlich vorkommende Treg-Zellen und induzierte Treg-Zellen unterteilt, wobei mittlerweile in der Literatur die *in vitro*-Generierung von verschiedenen Subpopulation von Treg-Zellen einen großen Anteil einnimmt (Wilczynski et al., 2008). Klassische Marker für Treg-Zellen sind extrazellulär die beiden Oberflächenmoleküle CD4 und CD25 (die  $\alpha$ -Kette des IL-2-Rezeptors) sowie intrazellulär die Expression des Transkriptionsfaktors Foxp3 (*Forkhead box protein 3*, (Sakaguchi et al., 1995; Hori et al., 2003)). Jedoch sind auch Foxp3-negative IL-10-Treg-Zellen beschrieben, welche regulatorische Fähigkeiten besitzen, jedoch keine Expression von Foxp3 aufweisen (Vieira et al., 2004).

Treg-Zellen können die Aktivierung von CD4- oder CD8-T-Zellen sowohl kontakt-abhängig durch Zell-Zell-Interaktionen hemmen, als auch durch die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IL-10 oder  $\text{TGF-}\beta$ .

Die T-Zell-vermittelte Immunität richtet sich vor allem gegen intrazelluläre Pathogene und aberrante endogene Zellen (z.B. Krebszellen). Infizierte Zellen (z.B. mit Viren) präsentieren körperfremde Substanzen auf spezifischen Oberflächenmolekülen ihrer Membran (siehe 2.1.3) und die spezifische Antigenerkennung durch CTLs führt zu einer Freisetzung von Perforinen, welche Kanäle in der Membran der infizierten Zellen bilden. Dadurch kommt es zu einem osmotischen Ungleichgewicht, welches den Tod der Zielzelle zur Folge hat. Durch Th1-Zellen aktivierte NK-Zellen töten ebenfalls

Tumorzellen und infizierte Zellen, während Makrophagen phagozytierte Mikroorganismen über reaktive Sauerstoffmetabolite ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  und  $\text{NO}^-$ ) abtöten (Martinez et al., 2008; Kapetanovic and Cavaillon, 2007; Janeway et al., 2002).

Die humorale Immunantwort wird durch B-Zellen ausgelöst und richtet sich gegen extrazelluläre Antigene. B-Zellen besitzen membranständige Immunglobuline als Rezeptoren (B-Zell-Rezeptor, *B cell receptor*, BCR), welche durch Bindung ihres spezifischen Antigens zur Aktivierung der B-Zellen führen. Ihre Differenzierung zu antikörpersezernierenden Plasmazellen erfordert gewöhnlich die Stimulation durch T-Helferzellen. Die Antikörper binden spezifisch an die entsprechenden Antigene und führen damit zur Neutralisierung, Opsonisierung (Bindung fördert Phagozytose) und/oder Aktivierung des Komplementsystems.

Eine ebenfalls wichtige Eigenschaft der adaptiven Immunantwort ist die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses durch langlebige B- und T-Gedächtniszellen, welche bei erneuter Infektion durch ein bekanntes Pathogen eine schnellere und wirksamere Reaktion ermöglichen.

### 2.1.3 Antigenpräsentierende Zellen und ihre Aufgabe

Als antigenpräsentierende Zellen (APC) bezeichnet man z.B. Dendritische Zellen (DCs), Makrophagen und B-Zellen. Diese Zellen sind in der Lage, antigene Substanzen aufzunehmen und nach Prozessierung T-Zellen auf Peptid:MHC-Komplexen zu präsentieren.

DCs sind in ihrer reifen, aktivierten Form für naive T-Zellen die wirksamsten APCs. Sie stammen von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab und wandern über das Blut zu den peripheren Geweben. Diese Zellen sind jedoch noch unreif und besitzen keine costimulatorischen Moleküle der B7-Familie (siehe 2.1.4). Werden über Phago- und Makropinozytose Antigene aufgenommen, reifen sie und ändern ihren Phänotyp. Die DCs wandern in die Lymphknoten ein und erhöhen die Expression ihrer MHC-I- und MHC-II-Moleküle, costimulatorischer B7-Moleküle und verschiedener Adhäsionsmoleküle wie interzelluläres Adhäsionsmolekül-1 (*intercellular adhesion molecule-1*, ICAM-1) oder funktionelles Leukozytenantigen-1 (*leukocyte functional antigen-1*, LFA-1), welche die Interaktion mit naiven T-Zellen und deren Aktivierung und Differenzierung zu T-Effektorzellen fördern.

Zusätzlich besitzen unreife DCs Rezeptoren für spezifische Oberflächenstrukturen von Mikroorganismen, deren Stimulation ebenfalls zur Reifung führt. Der Rezeptor für Lipopolysaccharid (LPS), einem Zellwandbestandteil gram-negativer Bakterien, ist bspw. bei der Maus der Toll-ähnliche Signalrezeptor-4 (*toll like receptor-4*, TLR-4), der anschließend den Transkriptionsfaktor *nuclear factor kappa-B* (NF $\kappa$ B) aktiviert. Daneben besitzt die unreife DC Rezeptoren für unmethylierte CpG-Dinucleotid-Motive bakterieller DNA, bakterielle Hitzeschockproteine und virale doppelsträngige RNA.

DCs sind somit optimal dazu geeignet, naiven T-Zellen ein breites Spektrum an Antigenen zu präsentieren.

Makrophagen beseitigen apoptotische und neoplastische Zellen und erkennen, ähnlich wie DCs, über eine Vielzahl von Rezeptoren mikrobielle Oberflächenbestandteile. Dazu zählen u.a. der Mannoserezeptor, der *Scavenger*- (Fress-) Rezeptor, Komplementrezeptoren sowie mehrere TLRs. Diese Rezeptoren vermitteln die phagozytotische Aufnahme von Mikroorganismen und induzieren die Sekretion proinflammatorischer Zytokine, die weitere Phagozyten anlocken und aktivieren. Außerdem sind Makrophagen in der Lage, Mikroorganismen nach Aufnahme in den Endo- und Lysosomen abzubauen und Peptide auf Peptid:MHC-II-Komplexen auf der Oberfläche zu präsentieren. Zusätzlich werden costimulatorische B7-Moleküle exprimiert (Taylor et al., 2005). Makrophagen stimulieren also T-Zell-Reaktionen gegen Krankheitserreger, die sie aufgenommen haben, aber nicht eliminieren können. Außerdem fressen sie entartete oder infizierte Zellen.

B-Zellen eignen sich besonders gut dazu, spezifische lösliche Antigene, bspw. bakterielle Toxine, durch Bindung an den BCR aufzunehmen. Nach Internalisierung des antigenbindenden BCRs wird das Antigen prozessiert und abgebaute Antigenfragmente als Peptid:MHC-II-Komplexe an der B-Zell-Oberfläche präsentiert. Die Aktivierung durch verschiedene Mikrobenbestandteile führt zu einer costimulatorischen Aktivität, durch welche sie erst in der Lage sind, naive T-Zellen vollständig zu aktivieren. Als Folge der spezifischen Interaktion mit T-Zellen können B-Zellen aktiviert werden und zu antikörpersezernierenden Plasmazellen werden. B-Zellen sind somit neben der Antikörper-Synthese darauf spezialisiert, Fragmente von Antigenen zu präsentieren, die an ihre Oberflächenimmunglobuline binden.

## 2.1.4 Die Antigenerkennung durch T-Zellen

T-Zellen besitzen zur Antigenerkennung auf ihrer Membran einen heterodimeren Rezeptor, der aus zwei Transmembranglykoproteinketten besteht. Es existieren zwei Formen dieser T-Zell-Rezeptoren (*T cell receptor*, TCR), welche durch Gene für vier Polypeptidketten codiert sind:  $\alpha$ : $\beta$ -TCR und  $\gamma$ : $\delta$ -TCR, wobei der  $\alpha$ : $\beta$ -Typ weitaus häufiger vertreten ist ( $\sim 95\%$ ). Im Gegensatz zum BCR besitzt der TCR nur eine Antigenbindungsstelle und ähnelt einem membrangebundenen  $F_{ab}$ -Fragment eines Antikörpers, dem Bestandteil von Antikörpern zur spezifischen Antigenbindung (Abb. 2.1, (Janeway et al., 2002)).

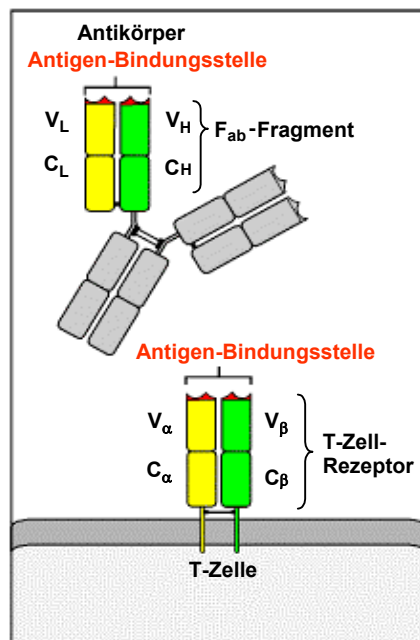


Abb. 2.1: Vergleich des Aufbaus vom TCR mit dem  $F_{ab}$ -Fragment eines Antikörpers.

$V_L$  bzw.  $V_H$  stellen die leichte bzw. schwere Kette der variablen Domäne des Antikörpers dar,  $C_L$  bzw.  $C_H$  die leichte bzw. schwere Kette der konstanten Domäne.  $\alpha$  und  $\beta$  bezeichnen die beiden Proteinketten des TCRs.

Aus (Janeway et al., 2002).

Der TCR ist mit den verschiedenen Ketten ( $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$  und  $\zeta$ ) des CD3-Komplexes assoziiert, welche bei Stimulation die Signaltransduktion in das Zellinnere initiieren (Abb. 2.2). Der CD3-Komplex wiederum ist mit verschiedenen weiteren Kinasen assoziiert, z.B. dem Zeta-Kette-assoziierten Protein-70 (*Zeta-chain associated protein of 70 kDa*, ZAP-70) und der Lymphozyten-spezifischen Kinase (*lymphocyte specific kinase*, Lck), durch welche die Signalkaskade ins Innere weitergeleitet wird (Friedl et al., 2005).

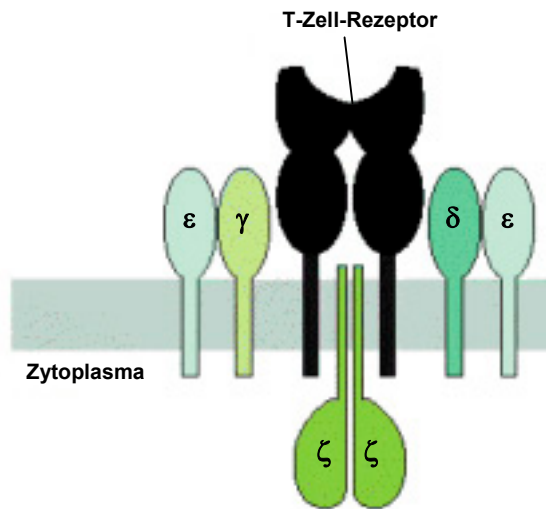


Abb. 2.2: **Der TCR und sein assoziierter CD3-Komplex.** Mit Ausnahme der  $\zeta$ -Kette besitzen alle Ketten extrazelluläre Domänen. Aus (Janeway *et al.*, 2002).

T-Zellen erkennen Antigene nur in prozessierter Form, in welcher sie auf Molekülen des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) auf der Oberfläche von APCs präsentiert werden. Man unterscheidet zwei Klassen von MHC-Molekülen. Beide bestehen aus zwei Polypeptid-Ketten, wobei MHC-I-Moleküle aus einer transmembranen  $\alpha$ -Kette und einem angelagerten  $\beta$ -Mikroglobulin bestehen und MHC-II-Moleküle aus zwei nichtkovalent gebundenen Transmembranketten ( $\alpha$  und  $\beta$ ). Die  $\alpha$ -Kette bei MHC-I- und die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten bei MHC-II-Molekülen bilden membrandistal eine Peptid-Bindungsfurche, die kleine Peptide als Abbauprodukte von Proteinen binden kann. Dabei zeigen sie eine breite Peptid-Bindungsspezifität und sind äußerst polymorph (Abb. 2.3).

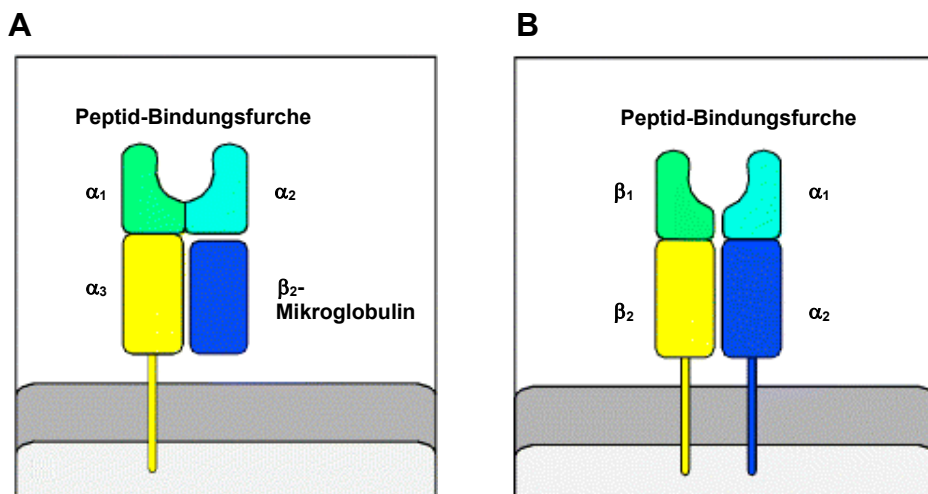


Abb. 2.3: **Aufbau der beiden MHC-Moleküle.** A) MHC-I-Molekül B) MHC-II-Molekül. Aus (Janeway *et al.*, 2002).

MHC-I-Moleküle werden über den TCR und eine CD8-Bindungsstelle von CTLs gebunden und präsentieren intrazelluläre Peptidpitope, welche im Zytosol durch den Abbau von Proteinen in Proteasomen entstehen. MHC-II-Moleküle binden dagegen über Bindung an den TCR und an CD4 Th-Zellen und präsentieren extrazelluläre Antigene, welche in Vesikeln (Phagosomen, Endosomen, Lysosomen) prozessiert und auf MHC-II-Moleküle geladen wurden (Janeway et al., 2002). MHC-I-Moleküle kommen dabei auf allen körpereigenen Zellen vor, während MHC-II-Moleküle auf eine Reihe von APCs beschränkt sind (B-Zellen, DCs und Makrophagen, aber auch Monozyten und CD4<sup>+</sup>-T-Zellen). Aufgrund ihrer Bedeutung bei der Interaktion mit den Peptid:MHC-Komplexen (MHCp) werden CD4 und CD8 auch als Co-Rezeptoren bezeichnet. Neben der Bindung des TCR an den MHCp-Komplex und die Co-Rezeptoren ist außerdem ein costimulatorisches Signal der APC für eine vollständige T-Zell-Aktivierung notwendig. Die am besten charakterisierten costimulatorischen Moleküle sind die Glykoproteine B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86). Der Rezeptor für die B7-Moleküle auf der T-Zelle ist CD28 (Abb. 2.4, (Greenwald et al., 2005)).

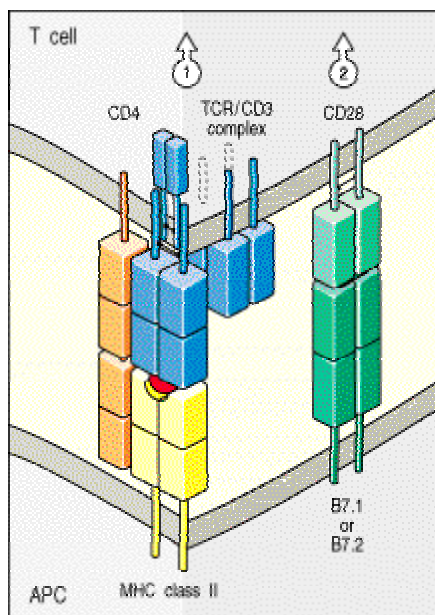


Abb. 2.4: **Signale, die zur Aktivierung von T-Zellen führen:** 1) Antigenpräsentation durch MHC-Molekül und -erkennung durch TCR 2) Costimulatorisches Signal durch Bindung von CD28 mit einem Molekül aus der B7-Familie. Aus (Janeway et al., 2002).

Aktivierte naive T-Zellen sezernieren IL-2 und exprimieren gleichzeitig den hochaffinen IL-2-Rezeptor auf ihrer Membran. Auf diese autokrine Weise wird das T-Zell-Wachstum angeregt und weitere T-Zellen parakrin stimuliert. Die hierauf folgende Proliferation der T-Zellen wird als klonale Expansion bezeichnet. Proliferation und Differenzierung eines T-Zell-Klones sind die Folge, und es bilden sich bewaffnete T-Effektorzellen. Diese können nun auf ihre Zielzellen auch ohne Costimulation reagieren. Bspw. werden CTLs

von DCs aktiviert und lösen bei jedem Zusammentreffen mit spezifischen Antigenen Effektorfunktionen aus, ohne dass dafür eine Costimulation erforderlich wäre. Daher kann ein CTL Zielzellen vernichten, die nur den MHCp-Liganden, aber keine costimulierenden Signale exprimieren (Janeway et al., 2002).

Im Gegensatz zur angeborenen wird die adaptive Immunantwort nicht an der Stelle des Antigeneintritts ausgelöst, sondern in den peripheren lymphatischen Organen wie dem Lymphknoten. Naive B- und T-Zellen, welche noch keinen Antigenkontakt hatten, zirkulieren kontinuierlich vom Blutkreislauf in die peripheren lymphatischen Organe. Im Falle einer Infektion nehmen APCs große Mengen des Antigens auf und wandern durch die afferenten Lymphgefäße in die Lymphknoten. Antigenspezifische T-Zellen werden hier bei Kontakt mit antigenbeladenen APCs zurückgehalten, proliferieren und differenzieren zu Effektorzellen, welche die Infektion bekämpfen können. B-Zellen, welche in einem Lymphknoten auf ihr spezifisches Antigen treffen, werden mit Hilfe aktivierter Th-Zellen ebenfalls festgehalten und aktiviert. Sollten die T-Zellen kein Antigen in dem Lymphknoten anfinden, verlassen sie diesen wieder über ein efferentes Lymphgefäß und gelangen über das Blut zu anderen Lymphknoten, während naive B-Zellen im Follikel des Lymphknoten bleiben.

## 2.2 Die Immunologische Synapse

Die Immunologische Synapse (IS) ist eine adhäsive Struktur, welche sich zwischen einer T-Zelle und einer APC ausbildet, mit der sie in funktionellen Kontakt tritt. Hierbei kommt es während der Interaktion zu einer Polarisierung und Umverteilung von verschiedenen Proteinen, sowohl intrazellulär im Zytosol als auch extrazellulär auf den Zelloberflächen der beteiligten Zellen. (Monks et al., 1998) konnten durch Dekonvolution von Immunfluoreszenzbildern erstmals zeigen, dass die Umverteilung von Proteinen innerhalb der Kontaktfläche zur Bildung von distinkten Bereichen führt, in denen bestimmte Proteine spezifisch angereichert werden („bull’s eye“-Struktur). Diese Bereiche werden als „supramolekulare Aktivierungscluster“ (*supramolecular activation cluster*, SMAC) und die Kontaktfläche in Anlehnung an die Synapsen neuronaler Netzwerke als „Immunologische Synapse“ bezeichnet.

Die klassische IS ist definiert durch das Auftreten von drei SMAC-Bereichen (Abb. 2.5):

- zentraler SMAC (*central SMAC*, cSMAC), in welchem vor allem Signalmoleküle angereichert sind, wie bspw. der TCR-MHC-Peptid-Komplex auf der

Zelloberfläche und die Proteinkinase C $\theta$  (PKC $\theta$ ) als eine Komponente der Signaltransduktionskaskade intrazellulär, welche an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt ist.

- peripherer SMAC (*peripheral SMAC*, pSMAC), der durch die Anreicherung von Adhäsionsmolekülen gekennzeichnet ist und welcher für die Stabilisierung der Interaktion verantwortlich ist. Ein prominenter Vertreter von Adhäsionsmolekülen ist das Integrin LFA-1 mit seinem Liganden ICAM-1. Auf intrazellulärer Seite stellt das Protein Talin eine Verbindung von IS mit dem Zytoskelett dar.
- Ferner werden bestimmte Proteine, welche scheinbar aufgrund ihrer Größe aus der Kontaktfläche und damit der IS ausgeschlossen werden, wie z.B. das Sialylglykoprotein CD43, einem dritten Bereich zugeordnet, welcher als distaler SMAC (dSMAC) bezeichnet wird.

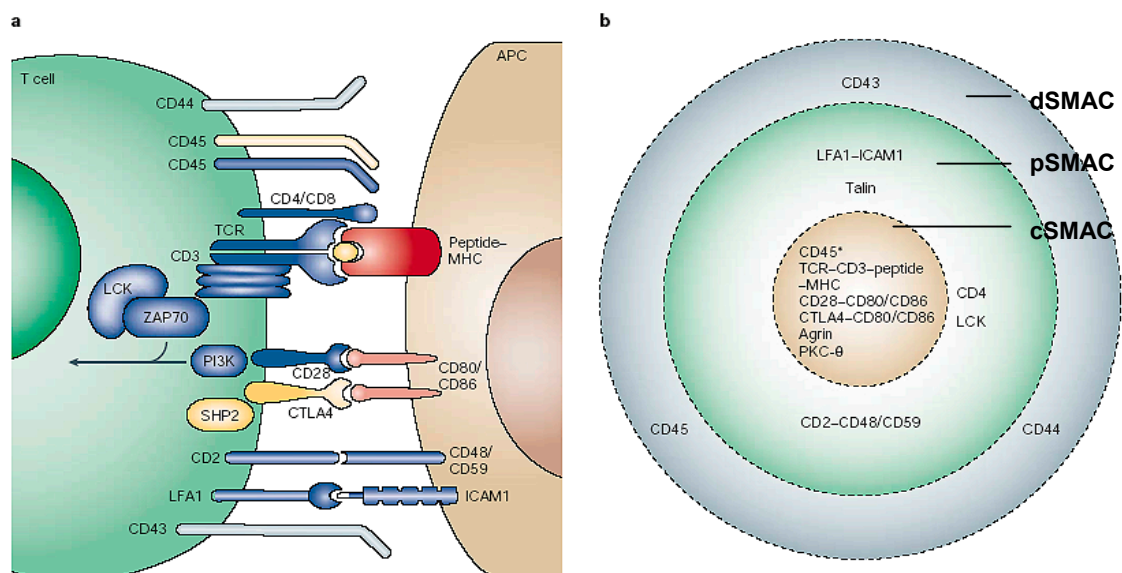


Abb. 2.5: **Die Immunologische Synapse zwischen T-Zelle und APC.** Dargestellt ist die charakteristische Anordnung von Oberflächenmolekülen in drei Regionen innerhalb der Kontaktstelle. A) Ansicht von der Seite. B) Aufsicht auf die Immunologische Synapse mit Bezeichnung der einzelnen Regionen. Nach (Huppa and Davis, 2003).

Bei Antigenerkennung kommt es innerhalb eines Zeitraumes von wenigen Minuten zu einer Anreicherung von TCR-MHCp- und LFA-1-ICAM-1-Komplexen in der Kontaktfläche. Dabei erfolgt zunächst die Bildung einer „unreifen“ IS, in welcher LFA-1-ICAM-1-Komplexe im cSMAC angereichert sind und TCR-MHCp-Komplexe im pSMAC. Aus dieser inversen IS erfolgt schließlich die Bildung der „reifen“ IS, mit der typischen cSMAC-pSMAC-Struktur (Abb. 2.6, (Grakoui et al., 1999)).



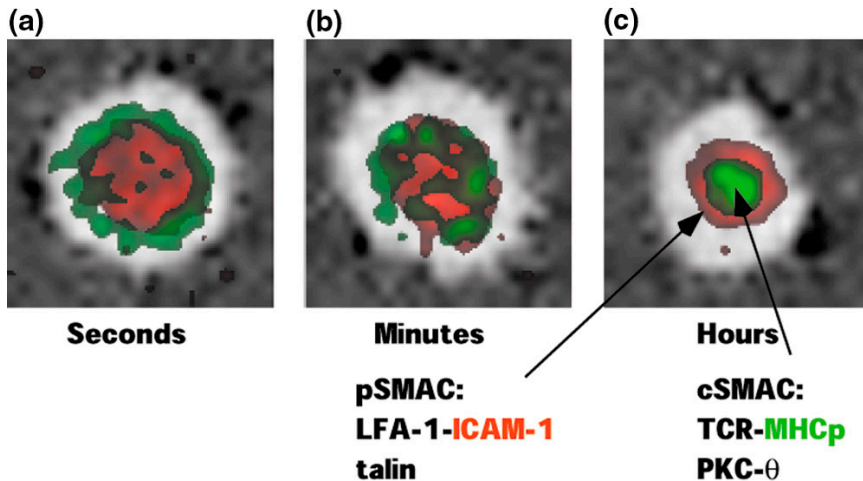


Abb. 2.6: **Bildung der Immunologischen Synapse.** In den ersten Sekunden nach der Antigenerkennung bildet sich eine unreife, inverse IS, in welcher LFA-1-ICAM-1-Komplexe im cSMAC akkumulieren (rot) und von TCR-MHCp-Komplexen umgeben sind (grün). Innerhalb von Minuten findet dann eine Neusortierung der Komplexe statt und es kommt zur Bildung einer reifen, klassischen IS, mit einem TCR-MHCp-cSMAC und einem LFA-1-ICAM-1-pSMAC. Adaptiert nach (Dustin, 2002).

Mittels TIRF-Mikroskopie konnte in Interaktionen von T-Zellen mit Lipid-Doppelmembran-Layern, in die mittels GPI-Anker fluoreszenzmarkierte Proteine gebracht wurden, gezeigt werden, dass es während der Formation der IS zur Bildung von „Microclustern“ kommt, welche in das Zentrum der Kontaktfläche fließen (Yokosuka et al., 2005). Diese Microcluster bestehen sowohl aus TCR- als auch phosphorylierten ZAP70 (pZAP70)-Molekülen. Zu Beginn der Interaktion sind beide Moleküle colokalisiert und fließen von der Peripherie der Kontaktfläche in dessen Zentrum. Die TCR-Moleküle akkumulieren schließlich im cSMAC, während die pZAP70-Moleküle im pSMAC verbleiben. Gleichzeitig fließen von der Peripherie immer wieder neue TCR-pZAP70-Microcluster in den cSMAC hinein (Abb. 2.7).

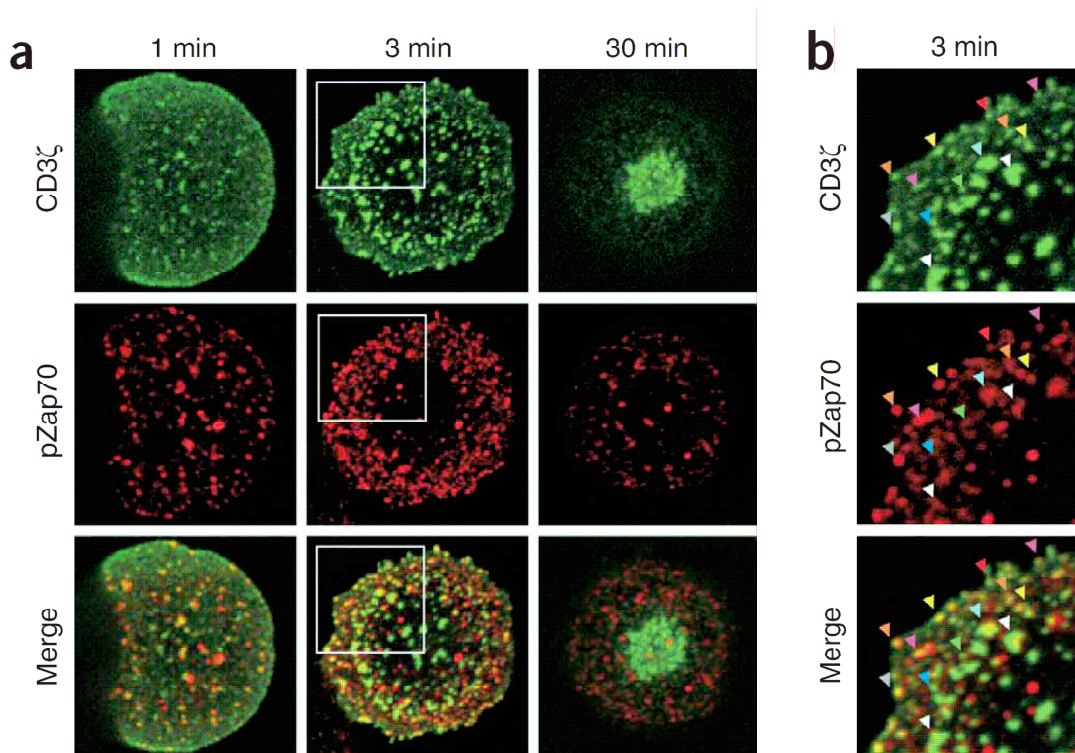


Abb. 2.7: **Bildung der IS durch Microcluster.** Gezeigt wird, wie Microcluster aus co-lokalisierten CD3 $\zeta$ - und pZAP70-Molekülen von außen in die Kontaktfläche fließen. Dabei trennen sich die CD3 $\zeta$ -Moleküle von den pZAP70-Molekülen, welche im cSMAC bzw. im pSMAC akkumulieren. Verändert nach (Yokosuka et al., 2005).

### 2.2.1 Auftreten der Immunologischen Synapse

Während Informationen über die Entstehung der IS anhand von verschiedenen *in vitro*-Modellen erhalten werden (z.B. Lipid-Doppelmembran-Layer, Jurkat T-Zellen und B-Zell-Hybridome, Transfektion von Fibroblasten sowie Isolation von primären T-Zellen und APCs), ist derzeit nicht bekannt, ob sich die IS ebenfalls *in vivo* bildet oder nur ein *in vitro*-Artefakt darstellt. Bisher konnte die *in vivo*-Formation einer IS-ähnlichen Struktur lediglich in Interaktionen von CD8-T-Zellen mit virusinfizierten Astrozyten gezeigt werden (Barcia et al., 2006).

Die Bildung einer klassischen IS *in vitro* (cSMAC-pSMAC-Struktur) wurde erstmals in Interaktionen von transgenen CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit B-Zellen beschrieben (Monks et al., 1998). Eine ähnliche Struktur wurde von (Stinchcombe et al., 2001) für Interaktionen von cytotoxischen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit Zielzellen beschrieben. Hierbei kommt es innerhalb des cSMACs zur Bildung von zwei distinkten Arealen: neben der Ansammlung von TCR innerhalb des cSMACs, werden außerdem lytische Granula im cSMAC sekretiert, welche Teil der zytotoxischen Effektorapparates sind und zur Apoptose der Zielzelle führen (Abb. 2.8).

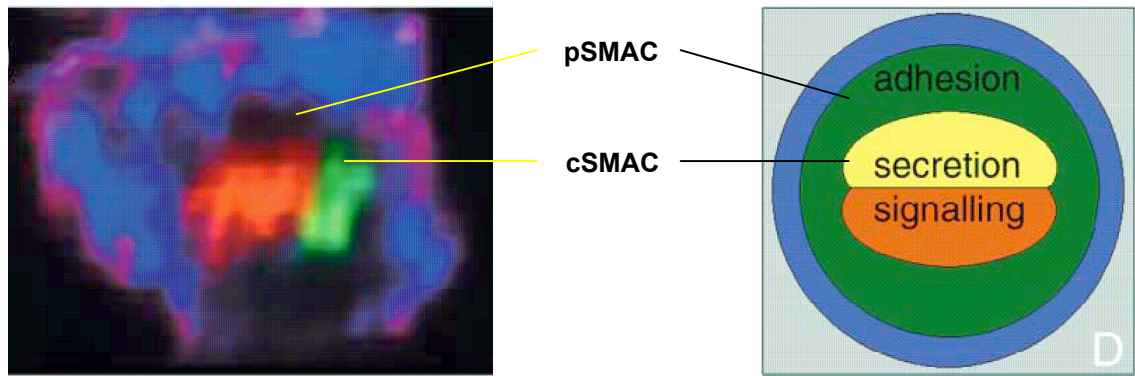


Abb. 2.8: **IS zwischen CD8<sup>+</sup>-zytotoxischer T-Zelle und Zielzelle.** Innerhalb des cSMACs kommt es zu einer funktionellen Zweiteilung in Signal- und Sekretionsareale (linkes Bild: Aktin [blau], Granzyme A [grün] und Lck [rot]; rechtes Bild: schematische Darstellung des linken Bildes). Verändert nach (Stinchcombe et al., 2001).

Kontrovers wurde die Bildung einer IS in Interaktionen von T-Zellen mit DCs diskutiert. Während (Benvenuti et al., 2004) die Formation einer klassischen cSMAC-pSMAC-IS beschrieben, konnten (Brossard et al., 2005), neben Immunfluoreszenz-Aufnahmen, in Elektronenmikroskopie- (EM-) Aufnahmen durch Analyse der Interaktionsfläche deutlich zeigen, dass DCs multifokale IS ausbilden. Hierbei kommt es zur Bildung von microclusterähnlichen Strukturen, in denen TCR-Akkumulationen von Adhäsionsmolekülen (wie z.B. LFA-1) umgeben werden und vielen kleinen cSMAC-pSMAC-Clustern innerhalb der Kontaktfläche zu entsprechen scheinen (Abb. 2.9).

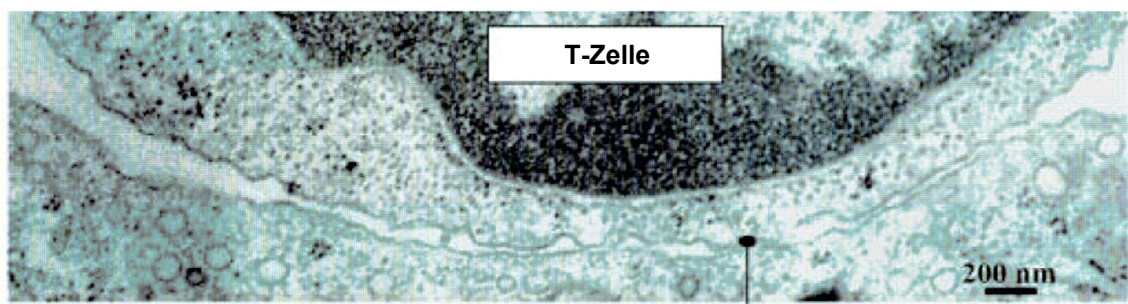


Abb. 2.9: **EM-Aufnahme eines Schnittes durch eine T-Zell-DC-Interaktion.** Die Breite der Furchen innerhalb der Kontaktfläche spiegelt die Breite der TCR-MHCp- bzw. LFA-1-ICAM-1-Komplexe wieder. Nach (Brossard et al., 2005).

## 2.2.2 Signaltransduktion innerhalb der Immunologischen Synapse

Nach Entdeckung der IS wurde angenommen, dass sie eine langanhaltende Ansammlung von TCR und Signaltransduktion ermöglicht und somit zur Aktivierung der T-Zelle führt (Grakoui et al., 1999). Allerdings konnte gezeigt werden, dass bereits vor Bildung der reifen IS die wichtigsten Signalkaskaden innerhalb der T-Zelle aktiviert und



bereits wieder beendet werden (Lee et al., 2002). Nach heutigem Verständnis stellt der cSMAC eine Balance zwischen TCR-Signalgebung und Degradation von TCR-Molekülen dar und reguliert somit die Signalstärke über den TCR (Purtic et al., 2005; Lee et al., 2003). Dieses Modell wurde anhand der Formation durch Microcluster, in denen während der Bildung der IS wichtige Phosphorylierungsereignisse geschehen, verifiziert (Yokosuka et al., 2005; Varma et al., 2006). Vor allem wurde gezeigt, dass der cSMAC inaktiv im Sinne der Signalgebung ist, aber die Microcluster permanent Signal geben.

In Abb. 2.10 wird ein Überblick über die wichtigsten Ereignisse der Signaltransduktion innerhalb der T-Zelle während der Interaktion mit einer APC gegeben.

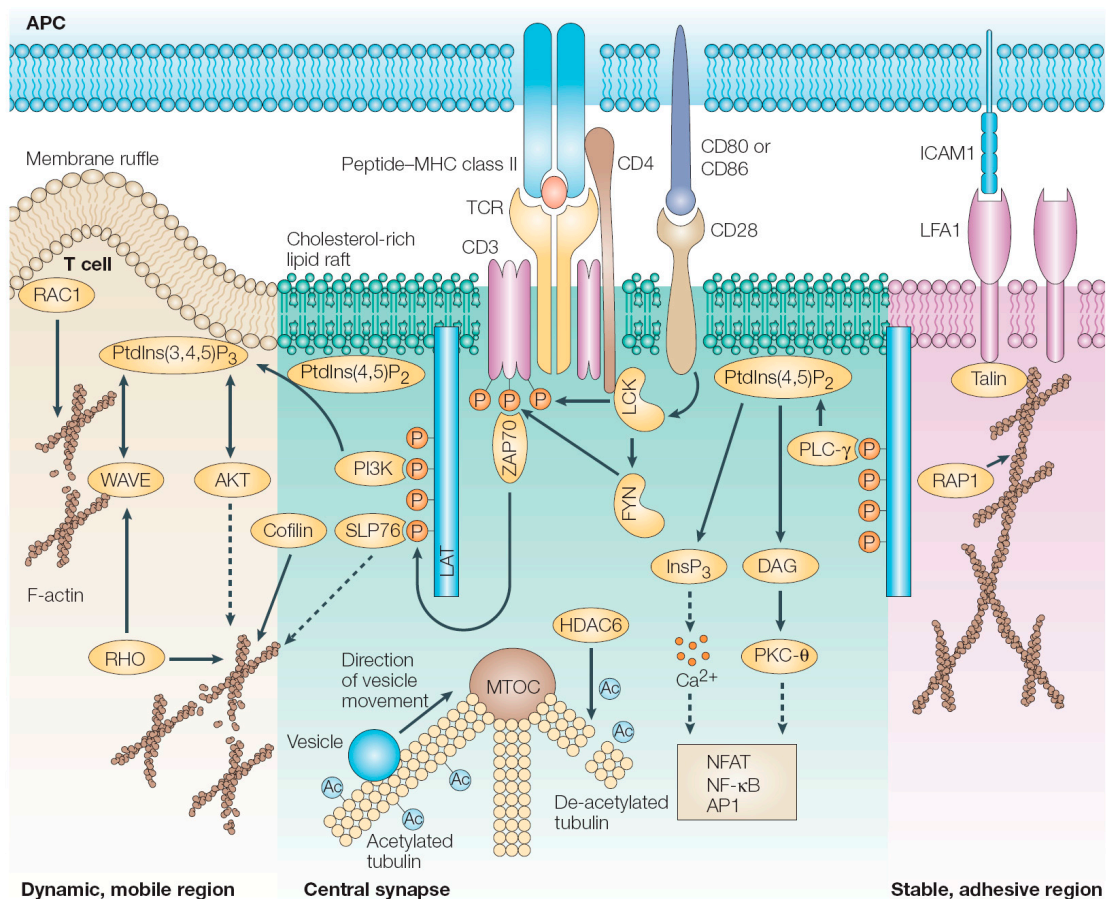


Abb. 2.10: **Signaltransduktion bei T-Zell-Aktivierung.** Überblick über die wichtigsten Ereignisse der T-Zell-Aktivierung während der Interaktion mit einer APC. Aus (Friedl et al., 2005).

Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der T-Zelle und Ausprägung einer IS spielt ebenfalls die APC, mit der die T-Zelle in Kontakt tritt. Während ruhende (naive) B-Zellen für eine starke T-Zell-Aktivierung mit einer großen Menge Antigen beladen sein müssen, reicht für DCs ein Bruchteil dieser Antigenmenge aus, um eine Population von

T-Zellen effektiv zu aktivieren (Gunzer et al., 2004). Gleichzeitig kommt dem Zytoskelett der APC eine entscheidende Funktion zu. Die Behandlung von naiven B-Zellen mit Inhibitoren des Zytoskeletts hat nur geringe Auswirkungen auf deren Fähigkeit, eine IS auszubilden oder T-Zellen zu aktivieren (Wulfig et al., 1998). Dies spiegelt die aktive Rolle der T-Zelle und die passive Rolle der B-Zelle bei diesem Prozess wider. Im Gegensatz dazu polarisieren DCs ihr Zytoskelett aktiv während T-Zell-Interaktion, und die Behandlung von DCs mit Zytoskelett-Inhibitoren führt zum Verlust der Fähigkeit, T-Zellen effektiv zu aktivieren (Al-Alwan et al., 2001). Im Folgenden soll eine kurze Einführung in die Struktur des Zytoskeletts gegeben werden.

### 2.3 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett ist ein aus verschiedenen Komponenten aufgebautes dynamisches Netzwerk im Zytoplasma jeder Zelle. Neben mechanischer Stabilisierung der Zellen und Formgebung, spielt es ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Migration von Zellen sowie dem Stofftransport innerhalb der Zelle und sensorischen Funktionen wie der Signalübertragung zwischen Zellen.

In der eukaryontischen Zelle unterscheidet man drei Klassen von Zytoskelettfilamenten, die jeweils von unterschiedlichen Proteinklassen gebildet werden, spezifische Begleitproteine besitzen und sich auf jeweils verschiedene Weise an den Aufgaben des Zytoskeletts beteiligen:

- Aktinfilamente,
- Mikrotubuli,
- Intermediärfilamente.

Im weiteren Verlauf wird nur auf die Aktinfilamente und die Mikrotubuli im Einzelnen eingegangen.

#### 2.3.1 Aktin

Aktin ist ein Strukturprotein, welches ubiquitär in eukaryontischen Zellen vorkommt. In der Zelle bildet Aktin dynamische Filamente (Aktinfilamente), welche eine zentrale Rolle bei der Stabilisierung der äußeren Zellform und intrazellulären Transporten spielen. Das Aktin-Monomer (globuläres Aktin, G-Aktin) besitzt eine Größe von 43 kDa und bindet ATP (Abb. 2.11).



Abb. 2.11: **Globuläres Aktin (G-Aktin)** mit gebundenem ATP und  $Mg^{2+}$ -Kation in der Tertiärstruktur-Darstellung. Nach (Kabsch et al., 1990).

ATP-gebundenes G-Aktin ist in der Lage mit weiteren Aktinmolekülen zu polymerisieren, wobei ATP unter Hydrolyse in  $ADP + P_i$  gespalten wird. Die entstehende Kette von Aktin-Monomeren bildet die filamentöse Form (Aktinfilamente, F-Aktin). Ein Aktinfilament besitzt einen Durchmesser von 7 nm und besteht aus zwei Ketten polymerisierter G-Aktin-Monomere, welche sich helixartig umeinanderwinden (Abb. 2.12).

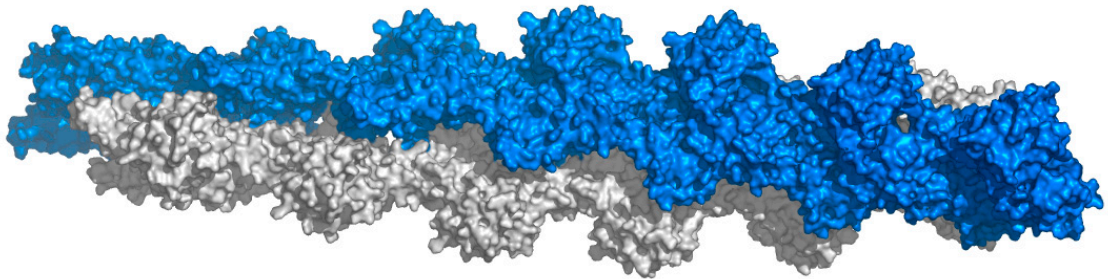


Abb. 2.12: **Aktinfilament im Atommodell.** Nach (Holmes et al., 1990).

Aktinfilamente sind sehr dynamisch in ihrem Auf- und Abbau. Sie besitzen eine Polarität mit einem (+)-Ende, an welches sich bevorzugt G-Aktin anlagert. Nach Bindung des Monomers kommt es zur Hydrolyse des gebundenen ATPs, wodurch die Bindungsstärke zu den benachbarten Aktin-Monomeren nachlässt. Am (-)-Ende erfolgt die Hydrolyse von ATP schneller als die Anlagerung neuer G-Aktin-Monomere, so dass es an diesem Ende zu einem Zerfall des Aktinfilaments kommt. Zahlreiche aktinbindende Proteine steuern die Polymerisations- und Depolymerisationsvorgänge. Bestimmte Proteine bedecken die Enden und behindern oder fördern die Verlängerung

oder den weiteren Abbau. Andere Proteine verhindern oder fördern die Polymerisation von G-Aktin oder bewirken den Zerfall des F-Aktin.

Ein wichtiger Proteinkomplex, welcher an der Initiation der Aktinpolymerisation beteiligt ist, ist der ARP2/3- (*actin-related protein-2/3*-) Komplex. Dieser Komplex setzt sich aus sieben Untereinheiten zusammen, mit zwei namensgebenden Aktin-verwandten Proteinen 2 und 3 (*actin-related protein*) und fünf als Arpc (*actin-related protein complex*) 1 bis 5 bezeichneten Proteinen (Abb. 2.13).

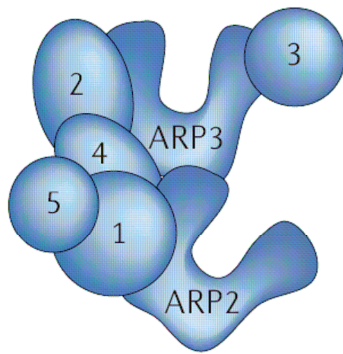


Abb. 2.13: **Der ARP2/3-Komplex.** Schematische Darstellung der Organisation des ARP2/3-Komplexes mit den Arpc-1 bis 5-Proteinen. Aus (Goley and Welch, 2006).

Es wird angenommen, dass der ARP2/3-Komplex aufgrund der homologen Struktur zu Aktin (45% Homologie) ein Aktin-Dimer oder Aktin-Trimer nachahmt und so als Nukleator in der Aktinfilamentbildung wirkt (Goley and Welch, 2006), da die spontane Bildung eines Aktin-Nukleationskeimes aus zwei bzw. drei Aktin-Monomeren ein energetisch eher ungünstiger und daher sehr langsamer Prozess ist (May, 2001). Der ARP2/3-Komplex an sich besitzt eine eigene, aber sehr geringe Nukleationsaktivität. Erst zusammen mit NPF (*nucleation-promoting factor*)-Proteinen wird der Komplex aktiviert und leitet die Aktinpolymerisation ein.

Dies kann auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen: zum Einen dient der ARP2/3-Komplex als Nukleationskeim, an dem Filamentwachstum stattfindet; zum Anderen kommt es durch die Anlagerung des Komplexes an ein bestehendes Filament zu einer Verzweigung in einem Winkel von 70°, so dass es zur Bildung eines Tochterfilaments kommt (Abb. 2.14). Der ARP2/3-Komplex lokalisiert in der Zelle in Bereichen hoher Aktindynamik, wie z.B. in Lamellipodien und Pseudopodien, nicht aber in Filopodien (Pantaloni et al., 2001; Disanza et al., 2005; Goley and Welch, 2006).

Die NPF-Proteine werden entsprechend ihrer Funktion in zwei Klassen eingeteilt. Zu den NPF-Proteinen der Klasse I zählen u.a. ActA, ein Oberflächenprotein von *Listeria monocytogenes* und die Proteine der WASP (*Wiskott-Aldrich syndrome protein*)/SCAR

(*suppressor of cyclic AMP repressor*)-Familie. Vertreter der Klasse II der NPF-Proteine sind z.B. Cortactin oder Abp1 (*actin-binding protein1*) (Goley and Welch, 2006).

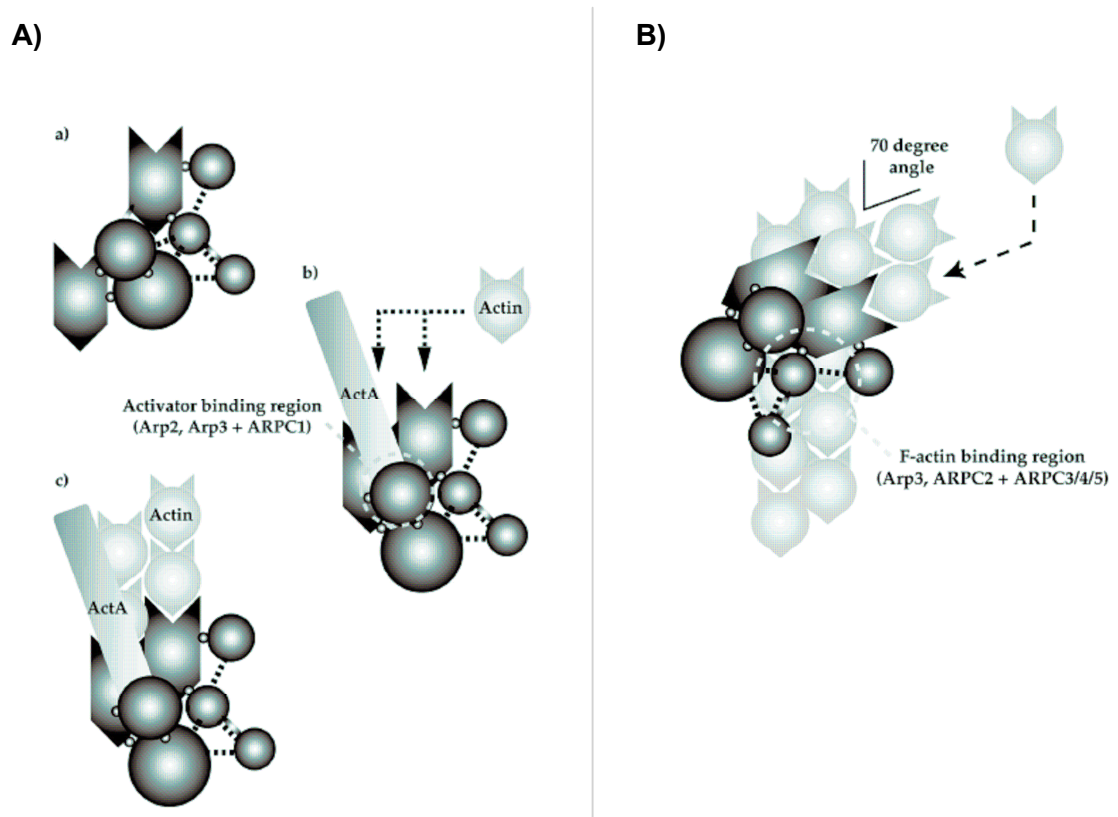
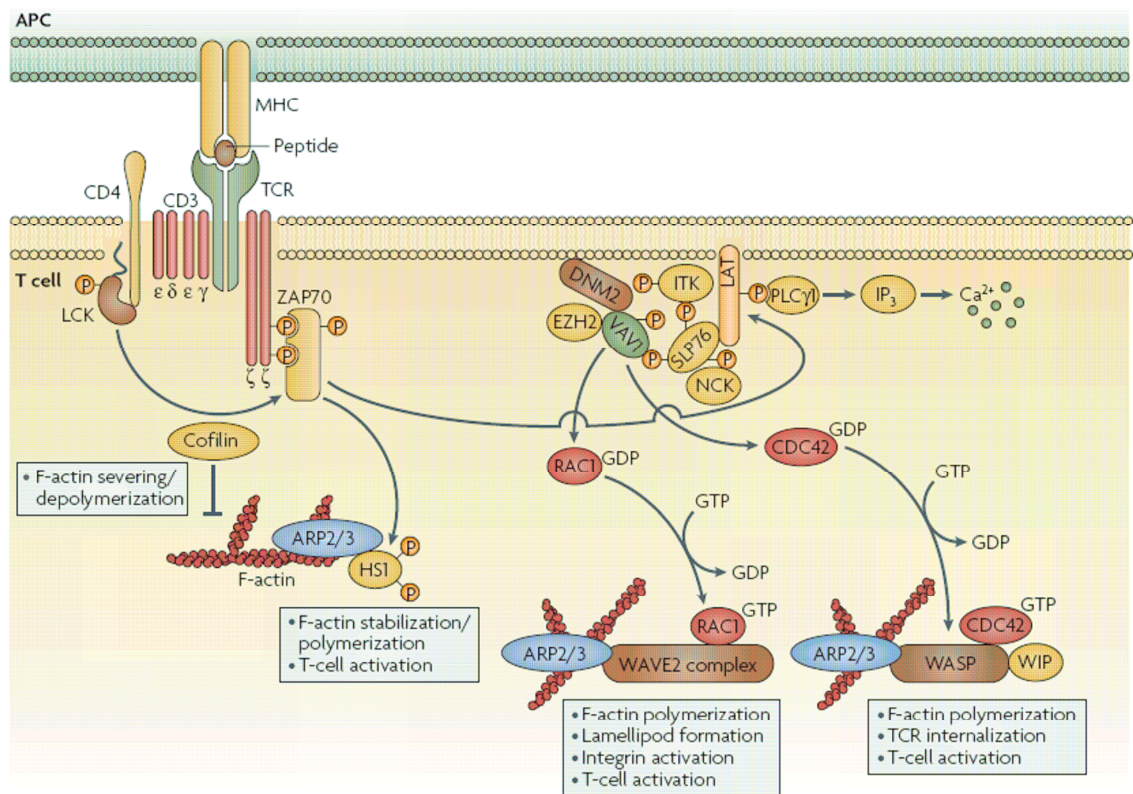


Abb. 2.14: **Aktinpolymerisation am ARP2/3-Komplex.** ARP2/3 als Initiationskeim für die Aktinpolymerisation (A). Verzweigung eines Aktinfilamentes durch Anlagerung des ARP2/3-Komplexes und Aktinpolymerisation eines neuen Filaments im Winkel von  $70^\circ$  zum bestehenden Aktinfilament (B). Aus (May, 2001).

Der ARP2/3-Komplex spielt, zusammen mit den NPF-Proteinen der WASP-Familie, eine wichtige Rolle bei der Regulation von F-Aktin und dessen Polarisation in T-Zellen. Die Interaktion von T-Zellen mit APCs führt zu einer starken Aktindynamik (Lamellipodien-Bildung) im Bereich der Kontaktfläche (Tskvitaria-Fuller et al., 2003). Es kommt zu einer Aktinakkumulation im Bereich der IS, welche durch zahlreiche TCR-proximale Signale initiiert wird (Abb. 2.15). F-Aktin spielt anschließend eine wichtige Rolle bei der TCR-Internalisierung, Integrin-Aktivierung und Lamellipodien-Formation.





**Abb. 2.15: Regulation der F-Aktinpolymerisation während der T-Zell-APC-Interaktion.** Hervorzuheben ist, dass der ARP2/3-Komplex sowohl durch die NPF-Proteine WAVE2-Komplex als auch durch WASP aktiviert wird und sich jeweils unterschiedliche Folgen für die weitere T-Zell-Aktivierung daraus ergeben. (Aus [Billadeau et al., 2007]).

### 2.3.2 Mikrotubuli

Mikrotubuli sind röhrenförmige Filamente mit einem Durchmesser von 24 nm, welche aus der Polymerisation von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Heterodimeren in helikaler Anordnung resultieren (Olmsted and Borisy, 1973; Downing and Nogales, 1998). Aufgabe der Mikrotubuli ist die mechanische Stabilisierung der Zelle und ihre Formgebung, gleichzeitig spielt das Mikrotubuli-Zytoskelett eine wichtige Funktion bei der Zellmigration und dem Stofftransport innerhalb der Zelle.

Ähnlich den Aktinfilamenten ist der Auf- und Abbau von Mikrotubuli ein dynamischer Prozess. In der Zelle liegt in der Regel ein Gleichgewicht zwischen polymerisiertem und depolymerisiertem Tubulin vor. GTP- $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimere bilden die Bausteine der Mikrotubuli. Nach Anlagerung des Heterodimers an einen bestehenden Mikrotubulus erfolgt die Hydrolyse von GTP zu GDP, wodurch das Filament wieder instabil wird und depolymerisiert (Desai and Mitchison, 1997). Im Gegensatz zum Aktinfilament, welches

an einer Seite wächst und an der anderen Seite zerfällt, laufen bei Mikrotubuli beide Prozesse (Polymerisation und Depolymerisation) am selben Ende gleichzeitig ab. Dieser Prozess wird als „dynamische Instabilität“ bezeichnet (Abb. 2.16).

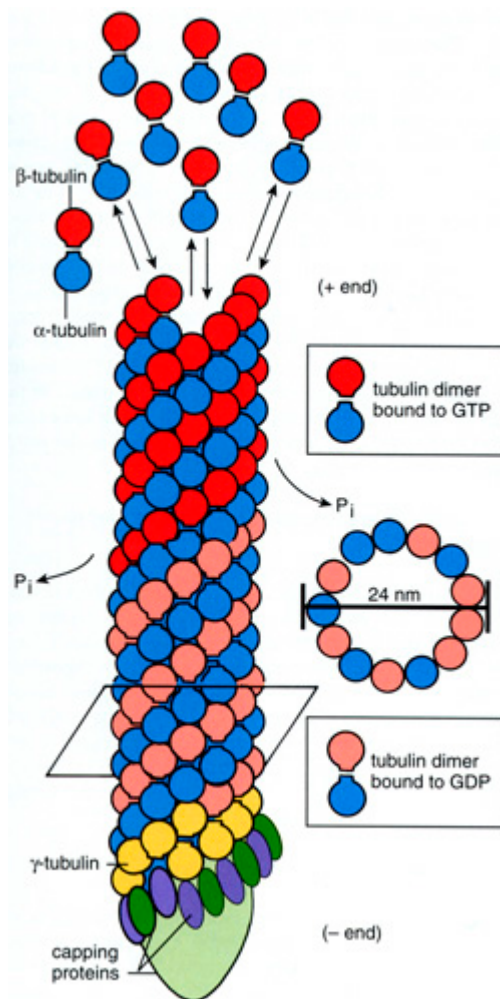


Abb. 2.16: **Schematische Darstellung der Tubulin-Polymerisation.**

GTP- $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimere lagern sich zu einem Protofilament an, wobei 13 Protofilamente nebeneinander helikal angeordnet einen Mikrotubulus ergeben. Nach Bindung des Dimers (am (+)-Ende) erfolgt die Hydrolyse von GTP zu GDP, wodurch der Mikrotubulus instabil wird und beginnt, auseinander zu fallen. Der Mikrotubulus schrumpft. Gleichzeitig lagern sich neue GTP-Tubulin-Heterodimere an das (+)-Ende an, wodurch er wieder wächst (dynamische Instabilität).

$\gamma$ -Tubulin hingegen ist kein Baustein der Mikrotubuli. Es ist vielmehr an der Initiation neuer Mikrotubuli am Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (*microtubule-organizing centre*, MTOC) beteiligt.  $\gamma$ -Tubulin bildet mit anderen Proteinen einen  $\gamma$ -Tubulin-Ring-Komplex ( $\gamma$ TuRC), welcher die Polymerisation von  $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimeren zur Bildung von Mikrotubuli initiiert.

Quelle:

[http://anatomy.iupui.edu/courses/histo\\_D502/D502f04/lecture.f04/cell.f04/cellimages/Ross238.jpg](http://anatomy.iupui.edu/courses/histo_D502/D502f04/lecture.f04/cell.f04/cellimages/Ross238.jpg)

Einen besonderen Stellenwert innerhalb des Mikrotubuli-Zytoskeletts nimmt das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (*microtubule-organizing centre*, MTOC) ein. In den meisten Zellen erfolgt das Wachstum von Mikrotubuli von diesem Startpunkt aus; dabei ist das (-)-Ende der Mikrotubuli mit dem MTOC assoziiert. Das MTOC an sich besteht aus den Zentriolen (27 Mikrotubuli in neun Triplets, welche über Filamente miteinander verbunden sind), der perizentriolaren Matrix und weiteren Proteinen, wie  $\gamma$ -Tubulin, welche als Startpunkt für die Polymerisation von  $\alpha\beta$ -Tubulin-Heterodimeren agieren (Moritz et al., 1995; Oakley and Oakley, 1989).

Ein wichtiges Modell zur Untersuchung der Polarisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts ist die Interaktion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit ihren Zielzellen. Hierbei polarisiert das Mikrotubuli-Zytoskelett zur Kontaktfläche (Kuhn and Poenie, 2002; Kupfer and Dennert, 1984), wobei die MTOC-Verlagerung von wenigen Signalmolekülen abhängig ist, wie bspw. ZAP70, LAT (*linker for activation of T cells*), SLP76 (*SRC homology-2-domain-containing leukocyte protein of 76 kDa*), VAV1, CDC42 und intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> (Ardouin et al., 2003; Kuhne et al., 2003; Lowin-Kropf et al., 1998; Martin-Cofreces et al., 2006; Stowers et al., 1995). An der Kontaktfläche kommt es schließlich zu einer gerichteten Sekretion von Zytotoxinen und lytischen Granula, welche über Motorproteine auf den Mikrotubuli zur IS transportiert werden (siehe Abb. 2.8, (Stinchcombe et al., 2006)). Das MTOC spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Sekretion von Interleukinen in Interaktionen von T-Helferzellen mit ihren APCs. So konnte gezeigt werden, dass Vesikel, welche IL-2, IL-4 oder IL-5 enthalten, über das Mikrotubuli-Zytoskelett zur Kontaktfläche transportiert werden (Kupfer et al., 1991; Reichert et al., 2001).

Die Polarisierung des Mikrotubuli-Zytoskeletts ist über verschiedene Signale mit der Stimulation des TCR verbunden. So interagiert das Mikrotubuli-Motorprotein Dynein mit ADAP (*adhesion- and degranulation-adaptor protein*) und reguliert damit die MTOC-Polarisation (Combs et al., 2006) in Jurkat T-Zellen. Gleichzeitig werden Mikrotubuli im integrinreichen pSMAC während der Interaktion mit APCs verankert (Kuhn and Poenie, 2002) und scheinen das Mikrotubuli-Zytoskelett über Motorproteine und Proteine des Aktin-Zytoskeletts (wie bspw. das ADAP/Vasodialator-stimulierte Phosphoprotein [VASP]) mit dem Aktin-Zytoskelett zu verbinden. Die Inhibition des Mikrotubuli-Zytoskeletts in T-Zellen mit Colchizin (ein Alkaloid aus der Herbstzeitlosen *Colchicum autumnale*, welches Tubulin bindet, somit die Polymerisation von Mikrotubuli verhindert und zu einer Depolymerisation bestehender Mikrotubuli führt) hat außerdem eine Beeinträchtigung der Ausbildung von Aktin-Protrusionen zur Folge (Bunnell et al., 2001). Schließlich spielt das Protein Histon-Deacetylase-6 (HDAC6) ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Umorientierung des MTOCs. So führt die Stimulation des TCR zu einer vorübergehenden Deacetylierung von Mikrotubuli, welche anschließend von einer Acetylierung gefolgt wird (Serrador et al., 2004). Eine Überexpression von HDAC6 hat außerdem eine gestörte TCR- und Integrin-Verteilung in der IS, eine fehlende MTOC-Polarisierung und eine beeinträchtigte IL-2-Produktion zur Folge (Serrador et al., 2004). Somit besitzt das MTOC eine wichtige Funktion bei der Erhaltung der Polarität, Exozytose und der Organisation der IS während der Interaktion von T-Zellen mit APCs.

## 2.4 Das Integrin LFA-1 und die Immunologische Synapse

Integrine sind Zelladhäsions-Moleküle, welche Zell-Zell-, Zell-Matrix- und Zell-Pathogen-Interaktionen vermitteln. Sie spielen im Immunsystem eine wichtige Rolle bei der Wanderung von Leukozyten durch den Körper, Zellmigration, Ausbildung der IS, Costimulation und Phagozytose. Außerdem stellen sie bei Adhäsionsvorgängen eine Verbindung zum Zytoskelett dar. Die Integrinaktivität, d.h. die Affinität für seinen Liganden, wird durch sog. „*inside-out signaling*“ dynamisch reguliert (Luo et al., 2007). Dies bedeutet, dass intrazelluläre Signalmechanismen zu einer Aktivierung von Zelloberflächen-Proteinen führen. Integrine sind Transmembran-Heterodimere, welche nicht kovalent miteinander verbunden sind und aus je einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit bestehen. Beim Menschen bilden wenigstens 18  $\alpha$ - und acht  $\beta$ -Untereinheiten durch Kombination 24 verschiedene Integrine (Takada et al., 2007).

Ein Integrin, welches eine zentrale Rolle im Immunsystem bei der Aktivierung von T-Zellen spielt, ist LFA-1. Dieses Integrin besteht aus den Untereinheiten  $\alpha_L\beta_2$  (CD11a/CD18) und wird neben T-Zellen, auch auf B-Zellen, DCs und anderen hämatopoetischen Zellen exprimiert. LFA-1 lokalisiert während der Interaktion von T-Zellen mit APCs in der IS im pSMAC und wird durch Bindung seines Liganden ICAM-1 als das wichtigste Integrin bei der Bildung von Zellpaaren angesehen (Dustin and Springer, 1989; Grakoui et al., 1999).

Auf der Zelloberfläche liegt LFA-1 nicht-aktiviert in der geschlossenen Konformation vor. Die Aktivierung erfolgt in zwei Schritten: Die geschlossene Konformation öffnet sich und gelangt in einen Intermediärzustand, mit einer erhöhten, aber nicht maximalen Affinität für den Liganden. Weitere Signale führen schließlich zu einem Wechsel in den hochaffinen Zustand mit einer maximalen Bindungsstärke des Liganden (Green et al., 2006). Die Aktivierung von LFA-1 ist ein fein abgestimmter Prozess und erfolgt über die  $\beta_2$ -Untereinheit. Eine Vielzahl von Mechanismen kann zur Aktivierung von LFA-1 führen. So führen bspw. Signale von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren zu einer Phosphorylierung der  $\beta_2$ -Untereinheit (Ginsberg et al., 2005).

Ein anderes prominentes Protein, welches den Aktivitätsstatus von LFA-1 reguliert, ist das Zytoskelettprotein Talin. Die Bindung der Kopfregion von Talin an die  $\beta_2$ -Untereinheit führt zu einer Dissoziation der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten und induziert damit einen Konformationswechsel in den extrazellulären Domänen, welcher schließlich die Affinität von LFA-1 für seinen Liganden erhöht (Ginsberg et al., 2005). Die Stimulation des TCR führt über verschiedene Signale zur Aktivierung von LFA-1. Der LAT/SLP76-Signalkomplex (bestehend aus den Proteinen LAT, SLP76, ITK [*interleukin-2-inducible*

tyrosine phosphatase], VAV1 und PLC $\gamma$ 1 [phospholipase C $\gamma$ 1]) aktiviert RhoGTPasen wie RAC (Nolz et al., 2006; Krawczyk et al., 2002; Goda et al., 2004; Katagiri et al., 2004; Woods et al., 2001; Finkelstein et al., 2005). Im Folgenden wird der WAVE2-Komplex durch RAC aktiviert und eine *de novo* Aktinpolymerisation durch Aktivierung des ARP2/3-Komplexes erfolgt. Talin bindet die LFA-1- $\beta$ <sub>2</sub>-Untereinheit, aktiviert so LFA-1 und stellt über die Bindung zu F-Aktin gleichzeitig eine Verbindung zwischen Integrin und Aktin-Zytoskelett her (Abb. 2.17).

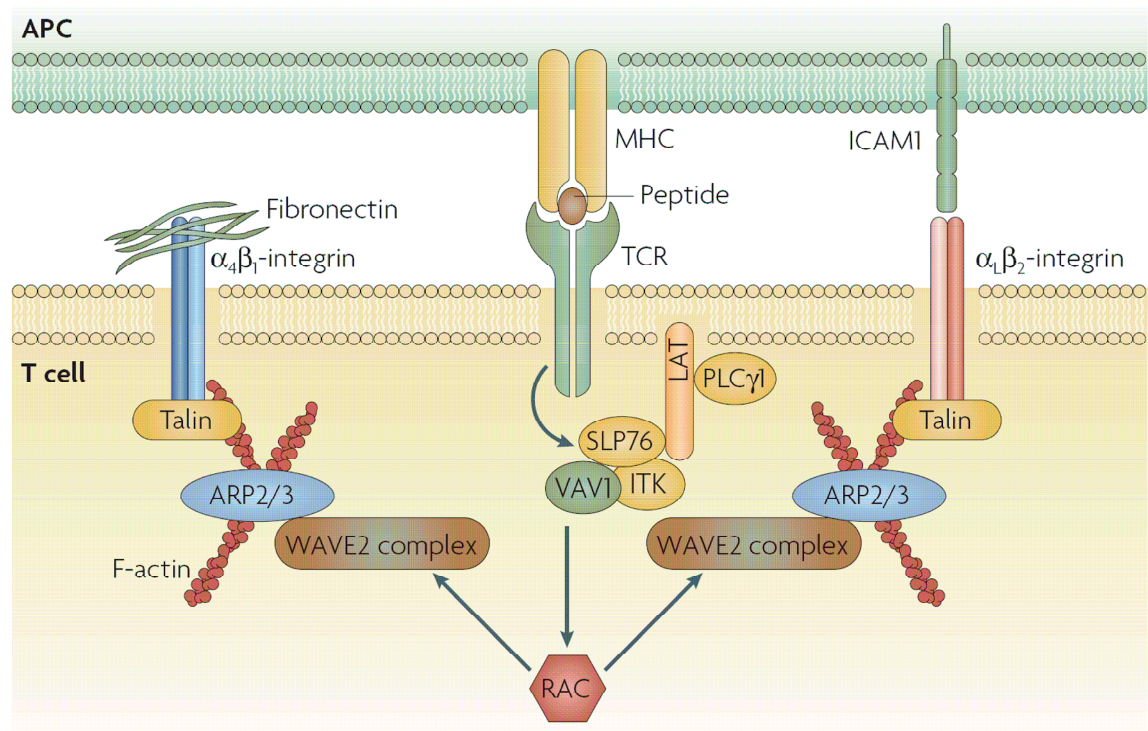


Abb. 2.17: **Integrin-Aktivierung in T-Zellen durch Stimulation des TCR.** Der LAT/SLP76-Signalkomplex führt zu einer Aktivierung der RhoGTPase RAC, welche über WAVE2 und ARP2/3 zu einer Rekrutierung von Talin zu den Integrinen  $\alpha$ <sub>4</sub> $\beta$ <sub>1</sub> (VLA-4) und  $\alpha$ <sub>L</sub> $\beta$ <sub>2</sub> (LFA-1) und deren Aktivierung führt. Aus (Billadeau et al., 2007).

Andere wichtige Proteine, welche an der Aktivierung von LFA-1 beteiligt sind, sind die *RAS-Family GTPase* RAP1, der ADAP/SKAP55-Komplex und das Protein Cytohesin (siehe hierzu 2.4.1). RAP1 bindet bei TCR Stimulation seinen Liganden RAPL (RAP1 Ligand) und aktiviert schließlich LFA-1 (Katagiri et al., 2003; Katagiri et al., 2004). Der ADAP/SKAP55-Komplex spielt zusätzlich bei der Rekrutierung von RAP1 zur Zellmembran eine wichtige Rolle (Kliche et al., 2006).



### 2.4.1 Regulation der Aktivität von LFA-1 durch Cytohesin-1 und CYTIP

Cytohesin-1 ist ein 47 kDa großes Protein, welches vorrangig in hämatopoetischen Zellen exprimiert wird (Kolanus et al., 1996). Es bindet spezifisch die intrazelluläre Domäne der  $\beta_2$ -Untereinheit von LFA-1 und spielt damit eine wichtige Rolle bei der Regulation von LFA-1-abhängiger Zelladhäsion. Überexpression von Cytohesin-1 in Jurkat T-Zellen erhöht bspw. die Bindung an den LFA-1-Liganden ICAM-1 (Kolanus et al., 1996). Cytohesin-1 gehört zu der Klasse der „*guanine exchange factors*“ (GEF) für ADP Ribosylierungsfaktor (ARF) GTPasen (Meacci et al., 1997), welche eine wichtige Rolle bei Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts spielen (Frank et al., 1998; Franco et al., 1999; Souza-Schorey et al., 1997). Sowohl die Bindung von Cytohesin-1 an die  $\beta_2$ -Untereinheit von LFA-1 als auch dessen Eigenschaft den ARF-GDP-GTP Austausch zu katalysieren, sind essenziell für eine Aktivierung von LFA-1 (Geiger et al., 2000). Cytohesin-1 wurde beschrieben als wichtiger Regulator bei LFA-1-abhängigen Prozessen, wie der Transmigration von Leukozyten (Weber et al., 2001) und der F-Aktin-vermittelten Veränderung der Zellform (Kliche et al., 2001).

Die Aktivität von Cytohesin-1 basiert auf einer Phosphoinositid-abhängigen Rekrutierung zur Plasmamembran. Dabei bindet die PH (*pleckstrin homology*) Domäne von Cytohesin-1 Produkte der PI3-Kinase, Phosphatidylinositol Phospholipide, wie PIP<sub>2</sub> oder PIP<sub>3</sub> (Nagel et al., 1998; Venkateswarlu et al., 1999). Über seine *coiled-coil*-Domäne bindet Cytohesin-1 das 43 kDa Protein CYTIP (*cytohesin-interacting protein*, Abb. 2.18), welches durch Delokalisation von Cytohesin-1 von der Zellmembran eine wichtige Funktion bei der Regulierung der Integrinaktivität besitzt.

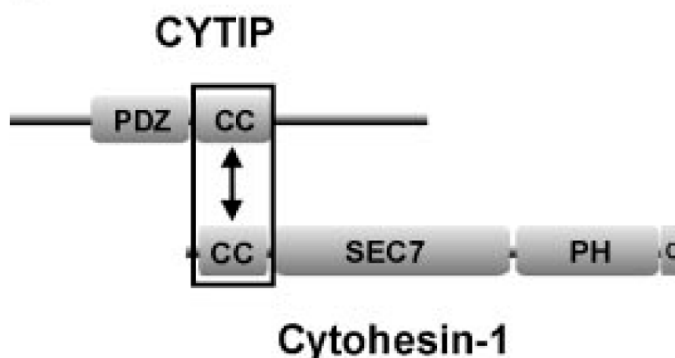


Abb. 2.18: **Interaktion von CYTIP mit Cytohesin-1.** Die Interaktion wird über Bindung der CC-Regionen (*coiled-coil*) beider Proteine vermittelt. Aus (Boehm et al., 2003).

CYTIP wird in reifen DCs bei Stimulation mit LPS und in anderen hämetopoetischen Zellen durch Zytokinstimulation aufreguliert (Tang et al., 2002; Boehm et al., 2003). Die Überexpression von CYTIP führt zu einer dominanten Inhibition der  $\beta_2$ -Integrin-vermittelten Adhäsion (Boehm et al., 2003). Hingegen führt der Knockdown von CYTIP

mittels siRNA in humanen DCs zu einer verstärkten Adhäsion von T-Zellen. Gleichzeitig ist die Fähigkeit dieser DCs, T-Zellen effektiv zu aktivieren, stark verringert (Hofer et al., 2006).

Im Folgenden soll schließlich eine Methode vorgestellt, die es ermöglicht, Adhäsionskräfte zwischen zwei Zellen, wie bspw. T-Zellen in antigenspezifischen Kontakten mit APCs, zu messen.

## 2.5 Rasterkraftmikroskopie

Das Rasterkraftmikroskop (*atomic force microscope*, AFM) ist ein zu den Rastersondenmikroskopen gehörendes Messgerät (Binnig et al., 1986; Rief et al., 1997) und dient zur Abtastung von Oberflächen und der Messung von atomaren Kräften auf der Nanometerskala bzw. im Piconewton-Bereich.

Die Messung geschieht mithilfe einer funktionalisierten Blattfeder (Cantilever). Ein piezoelektrisches Steuerelement ist in der Lage, Bewegungen des Cantilevers in der z-Achse im Nanometer-Bereich durchzuführen. Die Verbiegung des Cantilevers, welche durch Wechselwirkungen des Cantilevers mit der Probe hervorgerufen werden, können hochaufgelöst gemessen werden, indem ein Laserstrahl auf die Spitze des Cantilevers gerichtet wird und der reflektierte Strahl mit einem Photodetektor detektiert wird. Die Verbiegungen des Cantilevers geben, je nach verwendetem Betriebsmodus des AFMs Aufschluss über z.B. Oberflächeneigenschaften, wechselwirkende Kräfte von zwei Proben oder Struktur einer Oberfläche. Der Aufbau eines AFM ist in Abb. 2.19 dargestellt.

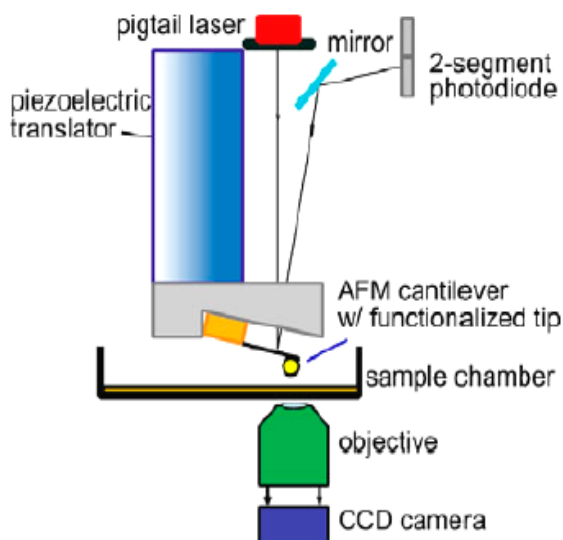


Abb. 2.19: **Schematische Darstellung einer AFM-Messapparatur.** Mit einem Piezosteurelement kann der Cantilever in der z-Achse bewegt werden. Ein Laser wird auf den Cantilever projiziert, reflektiert und das Signal auf eine 2-segmentige Photodiode umgeleitet, um Information über die Verbiegung des Cantilevers zu erhalten. Mittels einer Kamera kann von unten eine biologische Probe visualisiert werden. Aus (Wojcikiewicz et al., 2004).

Das AFM kann verwendet werden, um die Oberflächen von chemischen, physikalischen oder biologischen Proben optisch darzustellen, wie bspw. Proteine der bakteriellen Zellwand oder das Verhalten der Zellwand bei keimenden Aspergillus-konidien (Pelling et al., 2005; Dague et al., 2007). Zusätzlich wird das AFM für nicht-bildgebende spektroskopische Messungen verwendet, um elasto-plastische Eigenschaften einer Probe an einer definierten Stelle zu untersuchen. Es können hiermit Entfaltungskräfte gemessen werden, welche z.B. für die Herausziehen von Transmembranproteinen aus der Zellmembran nötig sind (Kessler and Gaub, 2006) oder Wechselwirkungen von zwei Proteinen. Ein prominentes Beispiel hierfür sind die Messungen der Wechselwirkungen von LFA-1 mit seinem Liganden ICAM-1 (Wojcikiewicz et al., 2006; Zhang et al., 2002). Dabei werden T-Zellen an einen Cantilever geklebt und auf immobilisierte ICAM-1-Moleküle gedrückt. Die bei der Trennung von T-Zelle und ICAM-1-Moleküle auftretenden Kräften geben Rückschlüsse über die Bindungskräfte zwischen LFA-1 und ICAM-1 (Abb. 2.20). Die Darstellung und Auswertung solcher Bindungsereignisse erfolgt in Kraft-Abstandskurven (siehe 3.16).

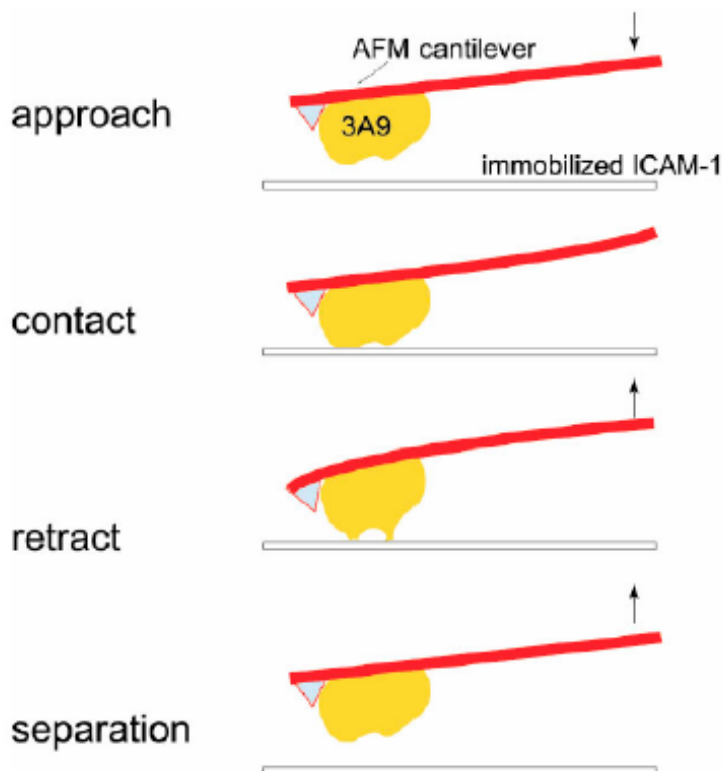


Abb. 2.20: **Messung der Bindungskräfte von LFA-1 mit seinem Liganden ICAM-1.** Der T-Zellklon 3A9 wurde an einen Cantilever geklebt und auf immobilisierte ICAM-1-Moleküle gedrückt. Bei Entfernung der T-Zelle auftretende Adhäsionen können gemessen werden und spiegeln die Bindungskräfte zwischen LFA-1 und ICAM-1 wider. Aus (Zhang et al., 2002).

Schließlich können mit dieser Methode ebenfalls zwei Zellen in räumlichen Kontakt gebracht und bei Trennung die Wechselwirkungen gemessen werden, wie die Experimente von (Benoit et al., 2000) mit *Dictyostelium discoideum* zeigen konnten.



## 2.6 Ziel der Arbeit

Interaktionen von T-Zellen mit verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen (APC) erscheinen sehr unterschiedlich und vielfältig. Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede der antigenspezifischen Interaktion von naiven T-Zellen mit verschiedenen APCs zu untersuchen. Es sollte untersucht werden, welche Unterschiede in der Formation der klassischen Immunologischen Synapse (IS) und der Polarisation des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts bei Interaktionen von T-Zellen mit naiven und aktivierten B-Zellen oder Dendritischen Zellen (DC) vorliegen. Zusätzlich sollte untersucht werden, welchen Effekt der Knockdown des Proteins CYTIP in DCs mittels siRNA auf die Interaktion mit und die Aktivierung von T-Zellen aufweist. Schließlich wurde die Frage behandelt, welche Bindungskräfte bei antigenspezifischen Interaktionen herrschen. Hierzu wurde Rastkraftmikroskopie eingesetzt.

Im Einzelnen sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- Wie sieht die Struktur der IS bei Interaktion von naiven T-Zellen mit unterschiedlichen APCs aus? Ist die Bildung der IS abhängig von der Menge an Antigen, welche appliziert wird?
- Wie unterscheidet sich die Lokalisation des Aktin-Zytoskelettproteins ARP2/3 und die Polarisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts bei den verschiedenen Interaktionstypen?
- Welchen Effekt hat ein CYTIP-Knockdown in DCs auf die Formation einer IS in Kontakten mit naiven T-Zellen? Führt ein CYTIP-Knockdown zu einer erhöhten Bildung des IS? Wie sieht die Aktivierung der T-Zellen durch CYTIP-siRNA-DCs aus? Aktivieren diese DCs naive T-Zellen genauso effizient, wenn sie mit Kontroll-siRNA behandelten DCs gemischt werden?
- Ist es möglich, ein System zur Messung von Bindungskräften bei Interaktionen von T-Zellen mit naiven B-Zellen oder DCs mittels Rasterkraftmikroskopie aufzubauen? Wie unterscheiden sich die Bindungskräfte bei den beiden Interaktionstypen?

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Zellkultur-Material

Verbrauchsmaterial in der Zellkultur wurde, soweit nicht anders angegeben, von Assistent, B. Braun, Becton Dickinson, Eppendorf, Falcon BD, Nunc, Sarstedt, Schott oder Terumo bezogen. Elektronische Geräte waren von den Firmen Biometra, Bio-Rad, Eppendorf, Heraeus, IKA Labortechnik und Schott.

#### 3.2 Chemikalien und Zusätze

Die verwendeten Chemikalien, Medien und Zusätze waren von p.A.-Qualität oder „extra rein“. Sie wurden von Becton Dickinson, Calbiochem, Cytogen, Fluka, Gibco, Invitrogen, Miltenyi Biotech, Molecular Probes, PAA, Roth oder Sigma bezogen und werden nicht einzeln aufgelistet.

#### 3.3 Medien und Puffer

Zellkultur-Medien wurden in 500 ml RPMI 1640 angesetzt und anschließend steril filtriert (Bottle-Top-System, Nalgene, Belgium). Puffer wurden, soweit nicht anders angegeben, in deionisiertem Wasser angesetzt, welches über das Milli-Q-System (Millipore, Schmalbach, Deutschland) aufgereinigt wurde und bei Einsatz in der Zellkultur autoklaviert. Mehrfach konzentrierte Stammlösungen wurden vor Gebrauch bis zur 1x-Konzentration mit Wasser verdünnt.

Tab. 3.1: **Medienzusätze des Bone Marrow Dendritic Cell- (BMDC-) Mediums.**

Bone Marrow Dendritic Cell-Medium	
β-Mercaptoethanol	50 µM
FCS (Gibco, Lot.Nr. 40F8123K)	5%
Gentamycin (Gibco, # 15750-037)	50 µg/ml
GM-CSF*	250 ng
IL-4*	25 ng
L-Glutamin	2 mM
NEAA	1x

\* gewonnen aus dem Kulturüberstand spezifischer murines GM-CSF und IL-4 produzierender Zell-Linien aus dem Labor von Thomas Blankenstein, MDC, Berlin.

Tab. 3.2: **Medienzusätze des Komplett-Kultur-Mediums (CM).**

Complete-Medium (CM)		
β-Mercaptoethanol	Gibco, # 31350-010	50 µM
FCS		10%
HEPES	Gibco, # 15630-106	10 mM
L-Glutamin	Sigma, G1250	2 mM
Natrium-Pyruvat	PAA, S11-003	1 mM
NEAA	Sigma, M7145	1 x
Penicillin / Streptomycin	Gibco, # 15070-063	100 U/ml

Tab. 3.3: **Zusammensetzung Erythrozyten Lyse-Puffer in 1l H<sub>2</sub>O.**

Erythrozyten-Lyse-Puffer (10x) auf 1 l H <sub>2</sub> O	
NH <sub>4</sub> Cl	82,92 g
KHCO <sub>3</sub>	10 g
EDTA	3,72 g

Tab 3.4: **Zusammensetzung PBS, PBS/FCS und MACS-Puffer.**

PBS (10x) auf 1 l H <sub>2</sub> O	
NaCl	80,0 g
KCl	2,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	14,3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,0 g
PBS/FCS	1x PBS, 1% FCS
MACS-Puffer	1x PBS, 2% FCS, 2mM EDTA

Tab. 3.5: **Igepal-Sucrose-Lysispuffer zur Herstellung von Zell-Lysaten.**

Igepal-Sucrose-Lysispuffer (2x) auf 1 l H <sub>2</sub> O	
Tris pH 7,5	50 mM
MgCl <sub>2</sub>	20 mM
NaCl	300 mM
Sucrose	10 % (w/v)

Tris, MgCl<sub>2</sub>, NaCl und Sucrose in H<sub>2</sub>O lösen und sterilfiltrieren. Vor Gebrauch 1:1 in H<sub>2</sub>O verdünnen und 1% Igepal (Sigma, I3021) frisch dazugeben. Zusätzlich eine Protease-Inhibitoren-Tablette (Roche, Deutschland) auf 10 ml lösen.

Tab. 3.6: **SDS-Probenpuffer für Western Blot-Analysen.**

4x SDS-Probenpuffer	
H <sub>2</sub> O	2,3 ml
Glycerin (87%)	4 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6.8	600 µl
5% (w/v) Bromphenolblau	200 µl
10% (w/v) SDS-Lösung	4 ml
β-Mercaptoethanol (konz.)	400 µl

Tab. 3.7: **Trenn- und Sammelgel-Zusammensetzungen für SDS-PAGE.**

Trenngel	10%iges Gel	12%iges Gel
dest. H <sub>2</sub> O	4,88 ml	4,08 ml
1,5 M Tris-HCl, pH 8,8	3,04 ml	3,04 ml
Acrylamid / Bis	4 ml	4,8 ml
10% SDS	120 µl	120 µl
TEMED	16 µl	16 µl
25% APS	16 µl	16 µl
Sammelgel		
dest. H <sub>2</sub> O	1,8 ml	
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	320 µl	
Acrylamid / Bis	330 µl	
10% SDS	25 µl	
TEMED	12,5 µl	
25% APS	12,5 µl	

Tab. 3.8: **SDS-Laufpuffer für SDS-PAGE.**

SDS-Laufpuffer (10x) auf 1 l H <sub>2</sub> O	
Tris-Base	30,3 g
Glycin	144,1 g
SDS	10 g

Tab. 3.9: **Transfer-Puffer für Tank-Blot.**

Transfer-Puffer (10x) auf 1 l H <sub>2</sub> O	
Glycin	144,1 g
Tris-Base	30,3 g
SDS	200 mg

Vor Gebrauch 1:10 in H<sub>2</sub>O und 20% Methanol verdünnen.

Tab. 3.10: **Waschpuffer für Proteinnachweis (frisch anzusetzen).**

TBS (10x) auf 1 l H <sub>2</sub> O, pH 7,6 mit HCl einstellen	
Tris-HCl	24,22 g
NaCl	80,0 g
TBS-T	1x TBS + 0,1% Tween-20
TBS-T / NaCl	1x TBS-T + 500 mM NaCl
TBS-T / Triton	1x TBS-T + 0,5% Triton X-100

Tab 3.11: **Ponceau-Färbelösung für PVDF-Membranen.**

PonceauS-Lösung in H <sub>2</sub> O	
PonceauS (Aldrich, # 14,119-4)	0.5%
Methanol (J.T. Baker, p.A.)	40%
Eis-Essig	15%

Tab. 3.12: **Membran-Stripping Puffer A und B.**

Strip-A	
Glycin	0,2 M
NaCl	0,5 M
pH 2.0 mit HCl einstellen	
Strip-B	
Tris	0,5 M
pH 11.0 mit NaOH einstellen	

Tab. 3.13: **Mowiol zum Eindeckeln von Immunfluoreszenzen.**

Mowiol	
Mowiol 488 (Calbiochem, # 471904)	2,4 g
Glycerin (87%, Sigma, # P-3130)	6 g
dest. H <sub>2</sub> O	6 ml
über Nacht rühren, dann	
Tris, pH 8,5	200 µl

Vor Gebrauch 900 µl Mowiol mit 100 µl N-Propylgallat (25 mg/ml in 87% Glycerin) mischen.

### 3.4 Mäuse

Die verwendeten Mäuse wurden unter tierärztlicher Aufsicht im Tierhaus des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung unter SPF-Bedingungen gehalten. Soweit nicht anders erwähnt, wurden Tiere verwendet, die zwischen 12 und 16 Wochen alt waren. Ankaufmäuse (Balb/c- und C57BL/6-Hintergrund) wurden von der Harlan-Winkelmann GmbH (Borchen, Deutschland) bezogen. Die T-Zell-Rezeptor-transgenen Mauslinien DO11.10 (Murphy et al., 1990), OT-I (Hogquist et al., 1995) und OT-II (Barnden et al., 1998) wurden im Tierhaus des Helmholtz-Zentrums gezüchtet. CD4<sup>+</sup>-T-Zellen der transgenen Mauslinien DO11.10 und OT-II erkennen spezifisch das Epitop der Ovalbumin-Aminosäuren 323-339 (OVA<sub>p</sub>) bei Präsentation durch MHC-II-IA<sup>d</sup>-Moleküle (Balb/c-Hintergrund bei DO11.10) bzw. durch MHC-II-IA<sup>b</sup>-Moleküle (C57BL/6-Hintergrund bei OT-II) (Robertson et al., 2000). Die Mauslinie OT-I hingegen ist eine CD8<sup>+</sup>-T-Zell-transgene Linie, bei welcher der CD8<sup>+</sup>-T-Zellrezeptor das Peptid SIINFEKL (Aminosäuren 257-264 aus Ovalbumin) bei Präsentation durch MHC-I-K<sup>b</sup> erkennt. (Sterry et al., 1995).

Im Folgenden wird bei der Beschreibung der Methoden auf eine Unterscheidung zwischen Balb/c- und C57BL/6-Mäusen und den entsprechenden transgenen CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen verzichtet. Balb/c- und C57BL/6-Mäuse wurden zur Isolation von antigenpräsentierenden Zellen (B-Zellen und Dendritische Zellen, siehe 3.5 und 3.6) verwendet, die T-Zell-Rezeptor-transgenen Mauslinien für die Isolation von T-Zellen. Sofern Versuche nur mit einem bestimmten Maustyp durchgeführt wurden, ist dies im Einzelnen explizit erwähnt.

### 3.5 Isolierung von Lymphozyten-Populationen aus der Milz

Die Mäuse wurden durch CO<sub>2</sub>-Zufuhr euthanasiert, die Milz entnommen, in PBS/FCS aufgenommen und mit dem Stempel einer 5 ml Spritze durch ein Zellsieb mit einem Porendurchmesser von 100 µm (BD Falcon, # 352360) gerieben. Nach Zentrifugation der Zellen (300xg für 5 min) wurde das Pellet in 5 ml pro Milz Erythorzyten-Lyse-Puffer resuspendiert und für 1 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Auffüllen auf 50 ml mit PBS/FCS gestoppt und die Suspension durch ein Zellsieb gegeben. Nach anschließender Zentrifugation wurden die Zellen in PBS/FCS resuspendiert und in einer Neubauer-Zählkammer gezählt (1:1 in 0,4%iger Trypanblau-Lösung zur Überprüfung der Vitalität).

Zur Isolation von T- oder B-Zellen aus dem erhaltenen Lymphozytengemisch wurde ein MACS-Zellseparation-System von Miltenyi Biotech verwendet. Hierbei werden nicht erwünschte Zelltypen durch Zugabe eines Antikörper-Cocktails durch biotinylierte Antikörper markiert. Anschließende Inkubation mit magnetischen anti-Biotin-MicroBeads ermöglicht es, mittels einer Separationssäule und eines starken Permanentmagneten, den gewünschten Zelltyp zu eluieren, während markierte Zellen in der Säule verbleiben (Negativ-Isolation). Die Reinheit der erhaltenen Zellpopulation beträgt bis zu 95%.

Die Anwendung des MACS-Kits erfolgte nach Herstellerangaben. Pro  $1 \times 10^7$  Zellen wurde die Milzzell-Suspension in 40  $\mu$ l PBS/FCS aufgenommen und für 10 min im Kühlschrank mit 10  $\mu$ l Antikörper-Cocktail des entsprechenden MACS-T-Zell oder B-Zell-Isolations-Kits inkubiert. Nach Zugabe von 30  $\mu$ l MACS-Puffer wurden die Zellen weitere 15 min mit 20  $\mu$ l anti-Biotin-MicroBeads im Kühlschrank inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit MACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und das Pellet in 500  $\mu$ l MACS-Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen resuspendiert. Die MACS-Zell-Separationssäulen wurden am entsprechenden MACS-Magneten befestigt und vor Nutzung mit 3 ml MACS-Puffer äquilibriert. Das Gemisch aus Milzzell-Suspension und MACS-Zell-Isolations-Kit wurde auf die Säulen gegeben und diese anschließend dreimal mit je 3 ml MACS-Puffer durchgespült. Die erhaltene T- oder B-Zell-Population wurde danach zentrifugiert, in PBS/FCS aufgenommen und konnte für weitere Versuche verwendet werden.

### **3.6 Generierung von Dendritischen Zellen aus dem Knochenmark**

Die Isolation und Kultur von Dendritischen Zellen (DCs) wurden durchgeführt wie beschrieben in (Inaba et al., 1992), das Protokoll hierbei leicht modifiziert. Femur und Tibia von euthanasierten Mäusen wurden entnommen und das Knochenmark anschließend mit einer 26G-Kanüle mit PBS/FCS aus den Knochen gespült und gut resuspendiert. Erythrozyten wurden mittels Erythrozyten-Lyse (siehe 3.5) depletiert und die Knochenmarks-Zellsuspension in 20 ml BMDC-Medium für 2 h in einer Petrischale ( $\varnothing$  10 mm, beschichtet, Corning Incorporated, # 430167) präplattiert. In dieser Zeit adhären Zellen, welche sich im weiteren Verlauf der Kultur zu Makrophagen differenzieren würden, während DC-Vorläuferzellen in der Suspension verbleiben. Der Überstand wurde schließlich abgenommen und je  $1 \times 10^7$  Knochenmarks-Zellen in 10 ml

BMDC-Medium für sieben Tage in Petrischalen (Ø 10 mm, unbeschichtet, Greiner, # 633180) inkubiert (37°C, 7% CO<sub>2</sub>). An Tag 3 wurde die Hälfte, an Tag 6 das komplette Medium gewechselt und die Zellen wieder entsprechend in BMDC-Medium ausplattiert. Am Tag 6 wurden die unreifen DCs zusätzlich ü.N. mit 20 ng/ml LPS (Sigma, L2630) stimuliert. Die reifen DCs konnten am folgenden Tag für Versuche eingesetzt werden.

### **3.7 Aktivierung von naiven Immunzellen *in vitro***

#### **3.7.1 Aktivierung von naiven B-Zellen**

Für die Aktivierung von B-Zellen wurden  $5 \times 10^6$  naive, frisch isolierte B-Zellen mit  $5 \times 10^6$  naiven, frisch isolierten CD4<sup>+</sup>-T-Zellen in 5 ml CM und Zugabe von 50 µg/ml OVAp (Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig, Peptidsynthese der AG Chemische Biologie) in einer 6-well-Platte (Nunclon Δ Surface, # 140675) im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert. Nach 72 h wurden die aktivierten B-Zellen über das MACS-Zellseparations-System isoliert (Re-MACS).

#### **3.7.2 Aktivierung von naiven T-Zellen**

Für T-Zell-Aktivierungs-Assays wurden naive, frisch isolierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen entweder mit naiven B-Zellen oder reifen DCs inkubiert. Bei Aktivierung durch naive B-Zellen wurden diese am Vortag isoliert, ü.N. mit 10 µg/ml OVAp beladen und vor Co-Kultur gewaschen, um nicht gebundenes OVAp aus dem Überstand zu entfernen. Jeweils  $1 \times 10^5$  T- und B-Zellen wurden in 200 µl CM in den Wells einer 96-well-Rundboden-Platte (Nunclon Δ Surface, # 163320) für 72 Stunden inkubiert. Bei Interaktion mit reifen DCs wurden diese 2 h vor Co-Kultur mit 10 µg/ml OVAp beladen und anschließend gewaschen.  $1 \times 10^5$  T-Zellen wurden dann mit  $1 \times 10^4$  DCs in 200 µl CM in den Wells einer 96-well-Rundboden-Platte für 72 h inkubiert. Nach Aktivierung wurden die T-Zellen über das MACS-Zellseparations-System isoliert.



### 3.8 Interaktion von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen

Zellinteraktionen wurden generiert, um anhand von Immunfluoreszenzen die spezifische Verteilung von Proteinen innerhalb der Immunologischen Synapse (IS) zu untersuchen. Für die Interaktion wurden hauptsächlich CD4<sup>+</sup>-DO11.10-T-Zellen und Balb/c-B-Zellen oder -DCs als antigenpräsentierende Zellen (APCs) verwendet. Lymphozyten und DCs wurden wie beschrieben isoliert und gegebenenfalls für entsprechende Versuche aktiviert (siehe 3.5. bis 3.7).

Die Inkubation der Interaktionen erfolgte in 200 µl CM in den Wells einer 96-well-Rundboden-Platte für 2 h im CO<sub>2</sub>-Inkubator. Naive B-Zellen wurden 24 h vor Interaktion mit T-Zellen isoliert und mit entsprechenden Konzentrationen OVA<sub>p</sub> beladen, anschließend gewaschen und im Verhältnis 1:1 mit T-Zellen inkubiert. Die Zellzahl schwankte hierbei in Abhängigkeit der Versuchsvorgabe. Aktivierte B-Zellen wurden parallel zu den naiven T-Zellen über Re-MACS isoliert und im Verhältnis 1:5 (T- zu aktivierten B-Zellen) inkubiert. Reife DCs wurden 2 h vor den Interaktionen ebenfalls mit entsprechenden Konzentrationen OVA<sub>p</sub> beladen und anschließend gewaschen. Das Verhältnis T-Zelle zu DC betrug bei den Interaktionen 1:10. Nach 2 h wurden die Zellen mithilfe von 200 µl Widebore-Spitzen (OmniLab, #2100553) auf mit Poly-L-Lysin (0,01% Lösung, Sigma) oder Fibronektin (25 µg/ml in PBS) beschichtete Deckgläschen (rund, Ø 12 mm) in einer 12-well-Platte transferiert und anschließend mit 4% PFA (4% w/v PFA in PBS) bzw. mit 0,1% Glutaraldehyd (2,5% Glutaraldehyd-Stammlösung in CB-Puffer [10 mM MES, 150 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM Glukose, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 6.1]) in 4% PFA für 20 min bei RT fixiert. Die Zellen wurden dann dreimal mit PBS gewaschen und konnten bis zur weiteren Verwendung für eine Woche bei 4°C gelagert werden.

### 3.9 Antikörper und Immunfluoreszenzen

Zur Detektion von Proteinen auf der Oberfläche von lebenden Zellen mittels *fluorescence activated cell scanner* (FACS), Mikroskopie von fixierten, permeabilisierten Zellen oder für die Verwendung im Western Blot wurden folgende Antikörper in dieser Arbeit verwendet (Tab. 3.14).

Tab. 3.14: **Verwendete Primärantikörper für Immunfluoreszenzen, FACS-Analysen**

**und Western Blots.** APC = Allophycocyanin; FACS = *fluorescence activated cell scanner*; IF = Immunfluoreszenz; Label. = Labeling (Markierung des Antikörpers) PE = R-Phycoerythrin; PerCP = Peridinin Chlorophyll a-Protein; WB = Western Blot

ANTIGEN	ISOTYP	KLON	HERSTELLER	LABEL.	VERWENDUNG
Aktin	Kaninchen	A2066	Sigma, A2066	---	1:5000 (WB)
ARP2/3	Maus	#323H3	AG Stradal	---	direkt (IF)
CD11c	Hamster	N418	BD, # 553800	PE	1:900 (FACS)
CD19	Ratte	1D3	BD, # 557399	APC	1:1000 (FACS)
CD25 (IL-2R)	Ratte	PC61	BD, # 553866	PE	1:3200 (FACS)
CD4 (L3T4)	Ratte	GK1.5	BD, # 553729	PE	1:1000 (FACS)
CD4 (L3T4)	Ratte	RM4-5	BD, # 557308	PerCP	1:1000 (FACS)
CD43	Ratte	S7	BD, # 553268	---	1:400 (IF)
CD45R (B220)	Ratte	RA3-6B2	BD, # 553090	PerCP	1:400 (FACS)
CD62L (L-Selectin)	Ratte	MEL-14	BD, # 553152	APC	1:600 (FACS)
CD69	Hamster	H1.2F3	BD, # 553237	PE	1:400 (FACS)
CD80 (B7.1)	Hamster	16-10A1	BD, # 553767	Biotin	1:400 (FACS)
CD86 (B7.2)	Ratte	GL1	BD, 553690	Biotin	1:400 (FACS)
CYTIP	Ratte	2F9	AG Kolanus	---	1:20 (WB)
DO11.10 TCR	Maus	KJ1.26	Caltag, MM7515	Biotin	1:20 (IF)
$\gamma$ -Tubulin	Maus	GTU-88	Sigma, T6557	---	5 $\mu$ g/ml (IF)
Tyr-Tubulin	Ratte	YL1/2	AG Wehland	---	direkt (IF)
pPKC $\theta$ (Thr 538)	Kaninchen	---	Cell Signaling # 9377-S	---	1:100 (IF)
pTyr	Maus	4G10	Cell Signaling # 16-103	---	5-10 $\mu$ g/ml (IF)
pZAP70 (Tyr 319)	Kaninchen	---	Cell Signaling # 2701-S	---	1:50 – 1:500
Talin	Maus	8D4	Sigma, B6059	Biotin	1:20

Primäre, unkonjugierte Antikörper wurden mittels fluorochromkonjugierter Sekundärantikörpern bzw. biotinylierte Antikörper mit markiertem Streptavidin nachgewiesen (Tab. 3.15). Immunfluoreszenzmarkierung des Aktin-Zytoskeletts wurden mittels fluorochromkonjugiertem Phalloidin durchgeführt. Phalloidin ist ein Toxin des Pilzes *Amanita phalloides*, welches die Eigenschaft besitzt, sich spezifisch an Aktinfilamente anzulagern (Cooper, 1987).

Tab. 3.15: **Verwendete Sekundärantikörper und fluorchromkonjugiertes Streptavidin für den Nachweis von Primärantikörpern, Phalloidin.** IgG & M = Immunglobulin Klasse G bzw. M; Cy3 = Cyanin-3

ANTIGEN	SPEZIES	LABELING	HERSTELLER CAT.NR	VERWENDUNG
Ratte IgG	Ziege	Alexa 488	Invitrogen A-11006	1:200 (IF) 1:400 (FACS)
Maus IgG & M	Ziege	Alexa 488	Invitrogen A-11029	1:200 (IF) 1:400 (FACS)
Ratte IgG & M	Ziege	Peroxidase	Dianova 112-035-062	1:4000 (WB)
Ratte IgG	Ziege	Cy3	Dianova 112-165-143	1:200 (IF)
Kaninchen IgG & M	Ziege	Peroxidase	Dianova 111-035-045	1:4000 (WB)
Biotin	Streptavidin	Cy3	Dianova 016-160-084	1:200 (IF)
Aktin	Phalloidin	Alexa 488	Invitrogen A-12379	2 U/ml (IF)

### 3.9.1 Färbungen lebender Zellen zur FACS-Auswertung

Die Färbung erfolgte in 96-well-Rundboden-Platten mit maximal  $1 \times 10^6$  Zellen pro Well in PBS/FCS. Antikörper-Inkubationen erfolgten ebenfalls in PBS/FCS für 30 min auf Eis. Bei Mehrschritt-Färbungen wurde zwischen den Inkubationen der verschiedenen Antikörper zweimal mit PBS/FCS für 5 min bei 300xg gewaschen. Nach der Färbung mit 1% PFA fixierte Proben wurden im Kühlschrank aufbewahrt und innerhalb von 24 Stunden gemessen.

### 3.9.2 Intrazelluläre FACS-Färbung

Für die Färbung von intrazellulären Proteinen wurde das Cytofix/Cytoperm-Kit von BD Biosciences (# 554714) verwendet und entsprechend der Herstellerangaben eingesetzt. Vor Beginn der intrazellulären Färbung wurden Oberflächen-Marker gefärbt und die Zellen anschließend mit Cytofix-Puffer fixiert und permeabilisiert. Nach zwei Waschschritten mit Cytoperm-Puffer, erfolgte die Antikörper-Inkubation ebenfalls in Cytoperm-Puffer. Die Waschschrritte erfolgten auch in Cytoperm-Puffer. Abschließend wurden die Proben einmal mit PBS/FCS gewaschen und am FACS gemessen.

### 3.9.3 Immunfluoreszenzen zur Konfokal-Mikroskopie

Fixierte Zellen wurden 45 sec mit 0,1% Triton (Sigma-Aldrich, #T8787) in PBS permeabilisiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen. Im Falle einer Glutaraldehyd-Fixierung wurden die Proben 5 min auf Eis mit frisch angesetztem 5 mg/ml NaBH<sub>4</sub> in eiskaltem PBS inkubiert, um die hochreaktiven Aldehyd-Gruppen abzureagieren. Zum Absättigen von unspezifischen Bindungsstellen wurden die Zellen anschließend 30 min bei RT mit 5% Pferdeserum (Invitrogen, #26050-088) in 1% BSA in einer feuchten Kammer inkubiert. Antikörper wurden in 1% BSA verdünnt und die Zellen weitere 30 min bei RT mit den jeweiligen Antikörpern inkubiert. Nach jeder Antikörper-Inkubation wurden die Deckgläschen mit den Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Abschließend wurden die Zellen in Mowiol auf Objektträgern fixiert.

### 3.10 Färben von Lymphozyten mit Carboxyfluoreszein Diazetat, Succinimidyl Ester (CFSE)

Lymphozyten wurden wie oben beschrieben isoliert, in PBS gewaschen und mit einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml in PBS resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5  $\mu$ M CFSE (Invitrogen, # C1157) für 10 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Durch Zugabe des doppelten Volumens PBS/FCS wurde die Reaktion abgestoppt. Die gefärbten Zellen wurden abschließend zweimal mit PBS/FCS gewaschen.

### 3.11 Proliferationsassay und Inhibitionsassay

Für Proliferationsassays wurden  $1 \times 10^5$  naive, CFSE-gefärbte T-Zellen mit  $1 \times 10^5$  OVAp-beladenen naiven B-Zellen bzw.  $1 \times 10^4$  OVAp-beladenen reifen DCs in 200  $\mu$ l CM in den Wells einer 96-well-Rundboden-Platte für mindestens 48 h bei 37°C inkubiert. Die Proliferationsrate der CFSE-gefärbten T-Zellen konnte anschließend im FACS gegen die Co-Kultur mit unbeladenen APCs gelesen werden. Als Positivkontrolle wurde ein Well mit 10  $\mu$ g/ml CD3-Antikörper in PBS für 30 min bei 37°C beschichtet, zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen auf die plattengebundenen Antikörper gegeben. Zur zusätzlichen Stimulation wurden 2  $\mu$ g/ml CD28-Antikörper in den Überstand gegeben. Für Inhibitionsassays (Reichardt et al., 2007) wurden  $1 \times 10^5$  naive T-Zellen mit  $1 \times 10^5$  OVAp-beladenen naiven B-Zellen für 72 h in 200  $\mu$ l CM in 96-well-Rundboden-Platten co-kultiviert und die erzeugten B-Zell-induzierten Treg-Zellen mittels Re-MACS wieder

isoliert. Naive, frisch isolierte und CFSE-gefärbte T-Zellen wurden dann mit einem Überschuss an erzeugten Treg-Zellen ( $1 \times 10^5$  naive T-Zellen plus  $3 \times 10^5$  Treg-Zellen) und  $1 \times 10^4$  reifen, OVAp-beladenen DCs inkubiert. Nach 72 h wurde die Inhibition der Proliferation am FACS ausgelesen. Als Negativkontrolle für fehlende Inhibition wurden anstelle der B-Zell-induzierten Treg-Zellen durch Kontakt mit reifen DCs aktivierte T-Effektorzellen im Überschuss in die Co-Kultur gegeben bzw. es erfolgte eine Kultur ohne Zugabe von aktivierten T-Zellen.

### 3.12 Protein-Knockdown in DCs mittels RNAi

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein Vorgang, bei dem mittels kleiner RNAs (*short interfering RNA*, siRNA) die Expression einzelner Gene durch Degradation der mRNA gehemmt wird (Fire et al., 1998; Guo and Kemphues, 1995). Dabei werden aus einer Vorgänger-RNA (doppelsträngige RNA, dsRNA) durch das Enzym Dicer einzelsträngige Sequenzen mit einer Länge von 21 bis 23 Nukleotiden geschnitten (= siRNA). Diese siRNA bildet zusammen mit anderen Proteinen einen Komplex, den *RNA-induced silencing complex* (RISC), bei dem die gebundene siRNA an eine komplementäre mRNA bindet und somit den Abbau der gebundenen mRNA initiiert. Die siRNA wird nach diesem Vorgang wiederverwendet. Bei Zellteilungen wird die siRNA verdünnt, so dass die Reduktion der Gen-Translation nur eine transiente in proliferierenden Zellen ist.

CYTIP-spezifische siRNA-Duplexe und Kontroll-siRNA wurden von Dharmacon (Perbio Science, Bonn, Deutschland) oder MWG (Ebersberg, Deutschland) bezogen und besaßen folgende Sequenzen (Tab. 3.16):

Tab. 3.16: Sequenzen der verwendeten siRNA-Konstrukte.

CYTIP		
Sense	5' -	CGA UAG AGA CUC UUA AUG G TT
Non-specific Control IX siRNA (MWG)		
Sense	5' -	AUU GUA UGC GAU CGC AGA C UU
siCONTROL Non-targeting siRNA #1 (Dharmacon)		
Sense	5' -	UAG CGA CUA AAC ACA UCA A

DCs wurden nach Protokoll kultiviert und am Tag 6 mit entsprechender siRNA in einem Gene Pulser X-Cell mit CE-Modul und Shock Pod (Bio-Rad, München, Deutschland) elektroporiert. Für die Elektroporation wurden die unreifen DCs geernet, einmal mit PBS und einmal mit OPTIMEM-Medium (Gibco, # 31985-047) gewaschen. Alle Medien wurden auf RT erwärmt. Anschließend wurden  $4 \times 10^6$  Zellen in 100  $\mu$ l OPTIMEM resuspendiert und zu 10  $\mu$ g CYTIP-siRNA oder Kontroll-siRNA in einer 4 mm Elektroporations-Küvette (Nunc, MB5540) gegeben. Nach 3 min Inkubation bei RT wurden die Zellen mit folgenden Einstellungen elektroporiert (Tab. 3.17):

Tab. 3.17: Einstellungen für die Elektroporation von DCs.

Elektroporations-Einstellungen	
Wellenform des Stroms	Square Wave
Spannung	1000 V
Anzahl der Pulse	2
Pause zwischen den Pulsen	0,5 ms

Anschließend wurden die Zellen zügig in 10 ml frisches BMDC-Medium in unbeschichteten 10 ml Petrischalen (siehe 3.6) überführt und ausplattiert. 48 h nach der Elektroporation wurden die DCs mit LPS stimuliert und am Tag 3 nach Elektroporation für Versuche eingesetzt. Die Knockdown-Effizienz wurde mittels Western Blot überprüft.

### 3.13 Herstellen von Zell-Lysaten

Um in vergleichenden Western Blot-Analysen genaue Proteinmengen einsetzen zu können, wurden aus lebenden Zellen Lysate hergestellt und anschließend deren Proteinkonzentration bestimmt. Zu lysierende Zellen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße überführt, für 10 min bei 300xg zentrifugiert, mit PBS gewaschen und anschließend wieder zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in Abhängigkeit der eingesetzten Zellen in 50-200  $\mu$ l Igepal-Sucrose-Lysispuffer aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate für 10 min bei 15.000xg und 4°C zentrifugiert, um Zellkerne und Zellfragmente zu sedimentieren. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration mittels MicroBC Assay (Uptima-Interchim, Mannheim, Deutschland, # UP75860C) bestimmt.

### 3.14 Proteindetektion im Western Blot

Zell-Lysate wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt (final 1x konzentriert) und bei 95°C für 5 min aufgeköcht. 20 µg Protein wurde in 10-12%igen SDS-Gelen mittels Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad) aufgetrennt (70 V bis Einlaufen ins Trenngel, 120 V bei Auftrennung im Trenngel) und die Proteine anschließend in einer Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell auf eine, durch Waschen in Methanol (96%) aktivierte und anschließend in Transfer-Puffer äquilibrierte, PVDF-Membran (Immobilon-P, Millipore, # IPVH00010) transferiert (80V für 1,5 h). Die Transfer-Effizienz wurde mit PonceauS-Lösung geprüft und die Membran dann mit 10% Milchpulver (Saliter Magermilch-Pulver) in TBS-T entweder für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C geblockt. Die Primärantikörper-Inkubation erfolgte in 1% Milchpulver in TBS-T für 1 h bei RT oder ü.N. bei 4°C. Die Membran wurde danach je 10 min mit TBS-T, TBS-T / NaCl, TBS-T / Triton und abschließend wieder mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit peroxidasekonjugierten Sekundärantikörpern erfolgte in 1% Milchpulver in TSB-T für 1 h bei RT, gefolgt von den vier oben beschriebenen Waschschritten und zusätzlichem Waschen mit deionisiertem Wasser. Die Membran wurde dann für 5 min mit dem Chemilumineszenz-Substrat Lumilight (Roche, # 12 015 196 001) inkubiert und anschließend zur Belichtung von Hyperfilm ECL (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) durch die Chemilumineszenz-Reaktion der auf der Membran detektierten Proteine verwendet. Die Inkubation von Membran mit Hyperfilm ECL erfolgte in Abhängigkeit der Signalstärke für 5 sec bis 30 min, die Filme wurde anschließend in einem Curix 50 Entwickler (AGFA, Leverkusen, Deutschland) entwickelt. Zur Überprüfung der eingesetzten Proteinmenge wurde die Membran anschließend mit TBS-T gewaschen und gestrippt. Dabei werden durch einen sauren und einen alkalischen Waschpuffer gebundene Antikörper von der Membran entfernt, um die Membran für einen zweiten Proteinnachweis einsetzen zu können. Zum Strippen wurde die Membran 5 min schwenkend bei RT mit Strip-A Puffer und anschließend 10 min schwenkend bei RT mit Strip-B Puffer gewaschen. Nach einem Waschschrift mit TBS-T, wurde die Membran erneut mit 10% Milchpulver in TBS-T geblockt und der Proteinnachweis mittels Antikörper-Inkubation wie oben beschrieben durchgeführt.

### 3.15 Kompetitiver T-Zell-Aktivierungsassay

Diese Form des T-Zell-Aktivierungsassays ist eine Erweiterung eines spezifischen T-Zell-Aktivierungsassays für zytotoxische T-Zellen, beschrieben bei (Hofer et al., 2006).

Reife C57BL/6-DCs, bei denen mittels siRNA die Expression des Proteins CYTIP inhibiert wurde, sowie reife Kontroll-siRNA behandelte DCs, wurden 72 h nach Elektroporation mit SIINFEKL oder OVA<sub>p</sub> beladen und gemischt. Anschließend wurden die Mischungen mit CD8<sup>+</sup>-OT-I- oder CD4<sup>+</sup>-OT-II-T-Zellen bzw. CD8<sup>+</sup>- oder CD4<sup>+</sup>-Wildtyp-T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen in 200 µl CM inkubiert. Alle T-Zellen wurden CFSE gefärbt und die Proliferation im FACS nach 3 Tagen bis 1 Woche ausgelesen. Die verschiedenen Versuchsansätze sind in Tab. 3.18 aufgeführt.

Tab. 3.18: **Mischung von DCs und T-Zellen im kompetitiven T-Zell-Aktivierungsassay.** Bei Versuchen mit Wildtyp-T-Zellen wurden  $1 \times 10^6$  T-Zellen pro Ansatz verwendet, um die Wahrscheinlichkeit einer antigenspezifischen Interaktion zu erhöhen. Bei Verwendung von OT-I und OT-II-T-Zellen wurden hingegen aufgrund der erhöhten Spezifität der transgenen T-Zellen nur  $1 \times 10^5$  im Aktivierungsassay verwendet.

CYTIP-siRNA DCs	Control DCs	CD4 <sup>+</sup> -T-Zellen (OVA <sub>p</sub> )	CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen (SIINFEKL)	INKUBATION
100% beladen ( $1 \times 10^5$ )	---	C57BL/6 ( $1 \times 10^6$ )	C57BL/6 ( $1 \times 10^6$ )	7 Tage
100% beladen ( $1 \times 10^4$ )		OT-II ( $1 \times 10^5$ )	OT-I ( $1 \times 10^5$ )	3 Tage
---	100% beladen	C57BL/6	C57BL/6	7 Tage
		OT-II	OT-I	3 Tage
10% beladen	90% unbeladen	C57BL/6	C57BL/6	7 Tage
		OT-II	OT-I	3 Tage
90% unbeladen	10% beladen	C57BL/6	C57BL/6	7 Tage
		OT-II	OT-I	3 Tage

### 3.16 Messung von antigenspezifischen Interaktionskräften mittels Kraftspektroskopie

Um die Kräfte zwischen T-Zellen mit APCs während antigenspezifischer Interaktionen zu messen, wurde die Methode der Kraftspektroskopie verwendet. Diese ist eine Weiterentwicklung eines Betriebsmodus' des Rasterkraftmikroskops (*atomic force microscope*, AFM) (Binnig et al., 1986; Rief et al., 1997). Die Messungen wurden am Lehrstuhl für angewandte Physik der Ludwig-Maximilians-Universität in München in der AG Biophysik durchgeführt. Das in der Arbeit verwendete AFM wurde am Institut aus einzelnen Komponenten selbst konstruiert (Abb. 3.1). Eine detaillierte Bauanleitung mit entsprechenden Hersteller- und Bezugsangaben befindet sich im Internet unter <http://www.biophysik.physik.uni-muenchen.de/PlasticAFM/>.



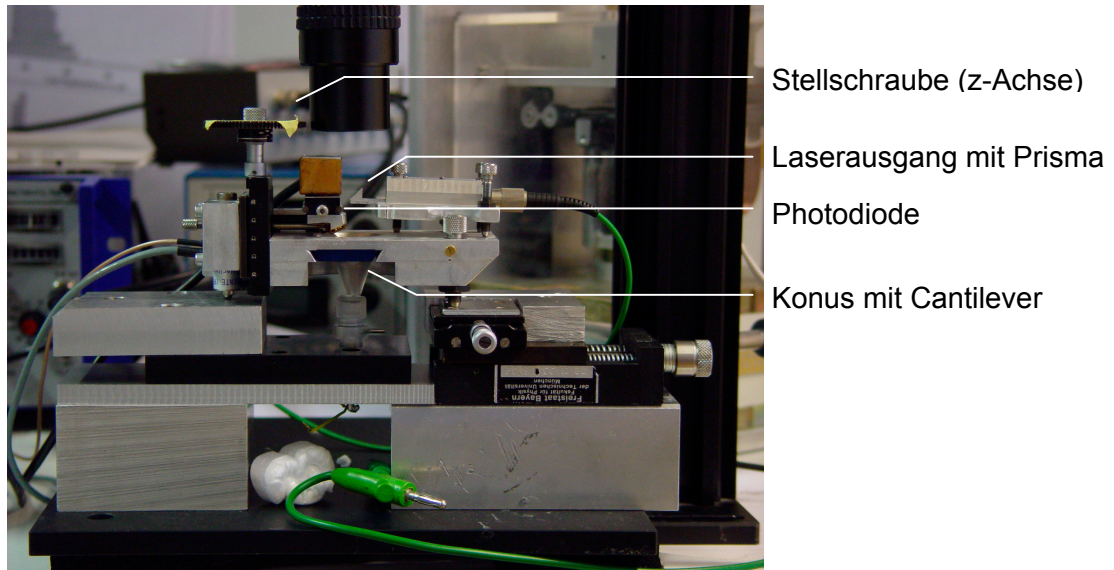


Abb. 3.1: Aufbau des für Kräftemessungen bei Zellinteraktionen verwendeten AFMs.

Die verwendeten Blattfedern (Cantilever) vom Typ C mit einer Federkonstante von 10 bis 20 pN/nm wurden von Veeco (Mannheim, Deutschland) bezogen. Das gesamte AFM wurde in eine auf 37°C erwärmte Styroporbox eingefasst und bei Messungen schwingungsgedämpft aufgehängt. Unterhalb des AFMs konnte eine Petrischale gelagert werden, die durch ein invertiertes Mikroskop mit integrierter und an einen Monitor angeschlossenen Kamera visualisiert wurde. Somit konnte die Positionierung des Cantilevers zur Oberfläche und der Probe kontrolliert werden (Abb. 3.2). Der Datenausgang über die Photodiode war mit einem Computer und entsprechender Datenerfassungs-Software verbunden (Igor PRO, Scientific Solutions, Lausanne, Schweiz).

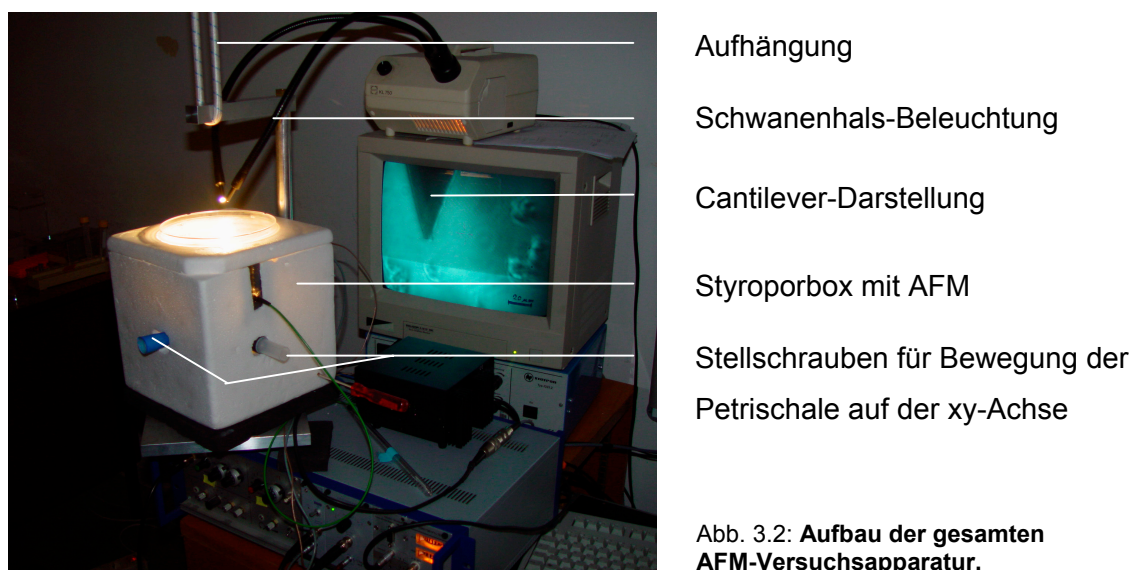


Abb. 3.2: Aufbau der gesamten AFM-Versuchsapparatur.

Für das Festkleben von OT-II-T-Zellen wurden die Cantilever mit 10 µg/ml CD43-Antikörper in PBS beschichtet (1 h bei RT) und dreimal mit PBS gewaschen. Eine definierte Stelle in einer Petrischale (Ø 10 mm, Nunc  $\Delta$  Surface, # 168381) wurde mit einem Tropfen Poly-L-Lysin beschichtet und nach Trocknen des Poly-L-Lysins mit einer Suspension von OVAp-beladenen naiven C57BL/6-B-Zellen oder reifen DCs überschichtet. Die Schale wurde nach 15 min Inkubation, in denen die Zellen auf der Oberfläche der Platte adhären konnten, mit 37°C warmen CO<sub>2</sub>-unabhängigem Medium (Gibco) aufgefüllt und auf die Petrischalen-Befestigung in der Styroporbox gelegt. Anschließend wurde das AFM so auf die Petrischale gelegt, dass der Konus mit beschichtetem Cantilever in das Medium eintauchte (Abb. 3.3).

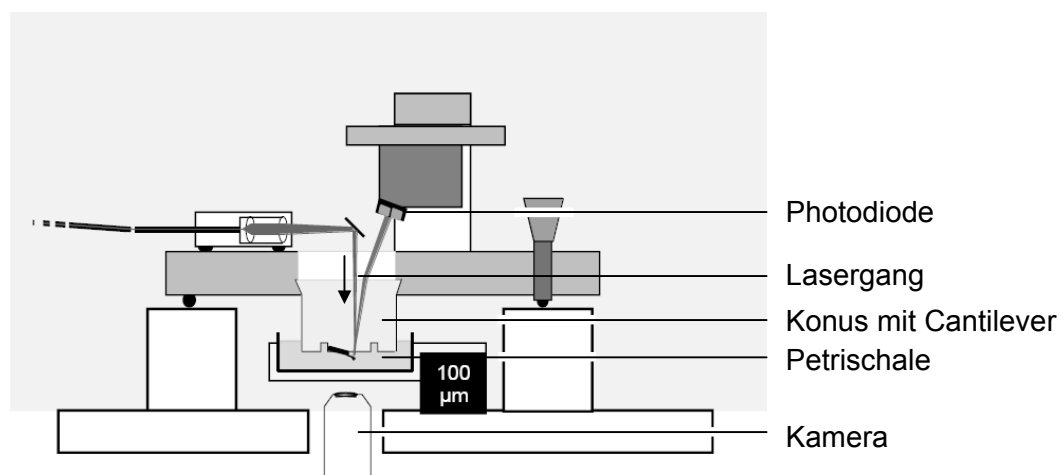


Abb. 3.3: **Schematische Darstellung eines AFMs mit Petrischale.** (aus Benoit M, Doktorarbeit, LMU München, 2000).

Vor Beginn der Messungen musste der Cantilever in der Flüssigkeit kalibriert werden. Hierzu wurde zuerst der Laserstrahl auf die metallbedampfte Oberfläche des Cantilevers gerichtet und so eingestellt, dass die Projektion des Lasers von dem Detektor (Photodiode) erfasst wurde. Anschließend wurde die Piezointensität eingestellt, um den Laserstrahl und die Wiedergabe der Daten zu kalibrieren (sind gemessene 10 µm auch 10 µm in der Wiedergabe?). Schließlich wurde die Eigenschwingung des Cantilevers in der Flüssigkeit gemessen, um Störsignale aus den Messungen herausrechnen zu können.

Nach Kalibrierung wurden die T-Zellen in das Medium gegeben und durch Druck des CD43-beschichteten Cantilevers auf die Zellen „gefischt“. Anschließend wurden sie in Kontakt mit den auf Poly-L-Lysin adhären B-Zellen oder DCs gebracht (Abb. 3.4).

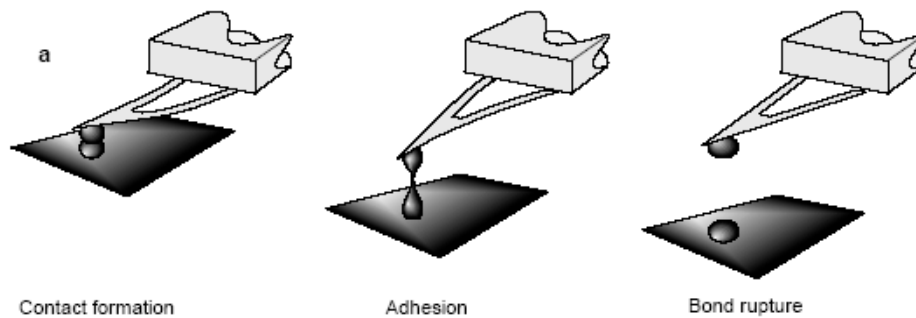


Abb. 3.4: **Schematische Darstellung der Messungen der Interaktionen von T-Zellen mit APCs.** Eine T-Zelle wurde am Cantilever festgeklebt, während die APC auf dem Plattenboden adhäriert ist. Nach Kontaktaufnahme werden die zur Trennung notwendigen Kräfte gemessen. Entnommen aus (Benoit et al., 2000).

Die Messungen erfolgten mit einer Kraft von 100 bis 500 pN, mit der die T-Zellen auf die APCs gedrückt wurden. Nach 0 bis 5 sec wurden die Kontakte wieder gelöst und die gemessenen Kräfte in einer Kraftabstandskurve dargestellt. Pro Ansatz (mit und ohne OVAp-Beladung, variierende Druckkräfte und Zeitdauer der Kontakte) wurden mehrere hundert Messungen durchgeführt. Als Kontrolle der gemessenen Adhäsionen und zur Absicherung, dass es sich um Zell-Zell-Kontakte bei den Messungen handelte, wurden zusätzlich die Adhäsion von beschichteten Cantilevern ohne befestigte T-Zelle im Kontakt mit APCs gemessen (im Fall, dass keine genaue Positionierung der T-Zelle erfolgte und die APC mit dem Cantilever in Kontakt kam), sowie die Adhäsion von T-Zellen auf den Petrischalen-Boden (im Fall, dass die T-Zelle an der APC vorbei die Petrischale berührt). Schließlich erfolgten Messungen durch Zugabe eines anti-MHC-II-Antikörpers (M5/114SN, 1:10), um die antigenabhängigen Interaktionen zu blockieren.

Die Darstellung der Daten erfolgte in Kraftabstandskurven (Abb. 3.5). Hierbei wird die Verformung des Cantilevers und der damit einhergehenden veränderten Laserreflektion auf die Photodiode optisch in einen Graphen übertragen. Die Trennung des Cantilevers von einer adhäsiven Probe führt im Graphen zu sog. Abrisspeaks.

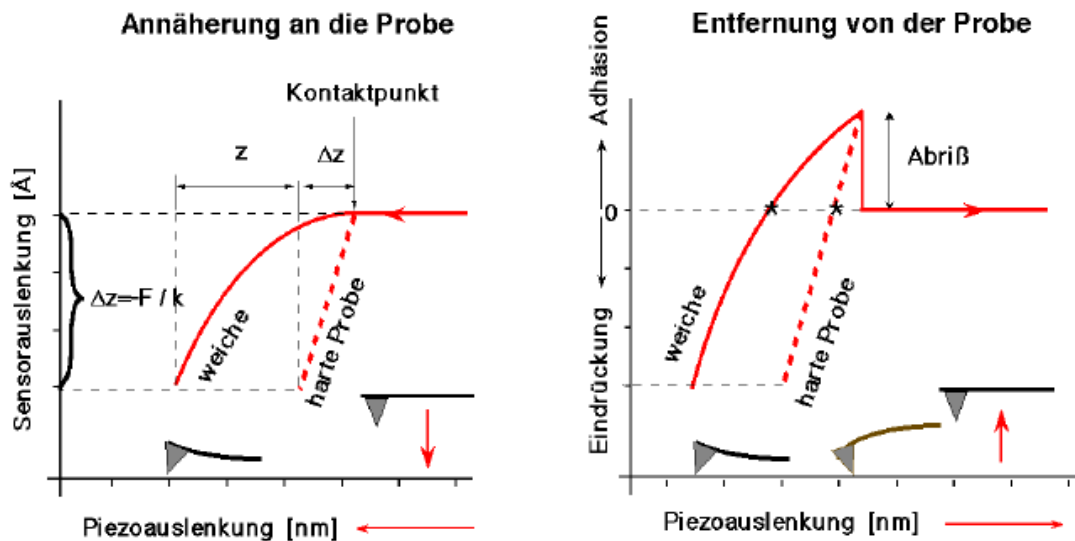


Abb. 3.5: **Darstellung von Messungen in Kraftabstandskurven.** Der Cantilever nähert sich einer Probe und wird durch Wechselwirkung der Cantilever-Spitze mit der Oberfläche der Probe konkav gebogen (links). Beim Entfernen von der Probe und im Fall von Adhäsion wird der Cantilever konvex gebogen, bis es zur Trennung von Cantilever und Probe kommt. Dieser Abriss erscheint in im Graph als Peak. Entnommen aus (Benoit M, Doktorarbeit, LMU München 2000).

Um Aussagen über die bei den Interaktionen gemessenen Kräfte treffen zu können, erfolgte die Auswertung der erhaltenen Daten in Form eines Verteilungsgraphen, in welchem die Anzahl von gemessenen Kräften aufgetragen wurden (Abb. 3.6). Die Abrisspeaks von erfolgreichen Messungen wurden dafür mit einer speziellen, selbst programmierten Software vermessen und aufgetragen.

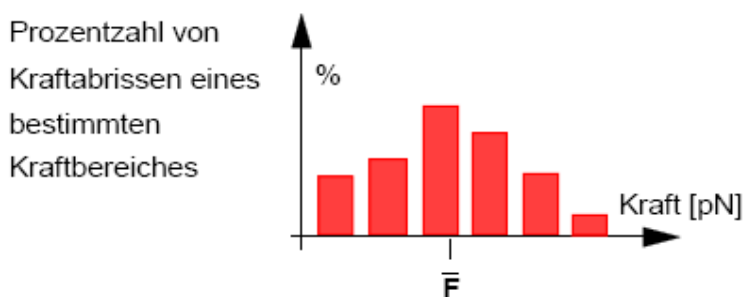


Abb. 3.6: **Darstellung der gemessenen Abrisskräfte in einem Verteilungsgraph.** Anzahl der gemessenen Kräfte wird gegen die jeweilige Kräfte aufgetragen. Entnommen aus (Benoit M, Doktorarbeit, LMU München 2000).

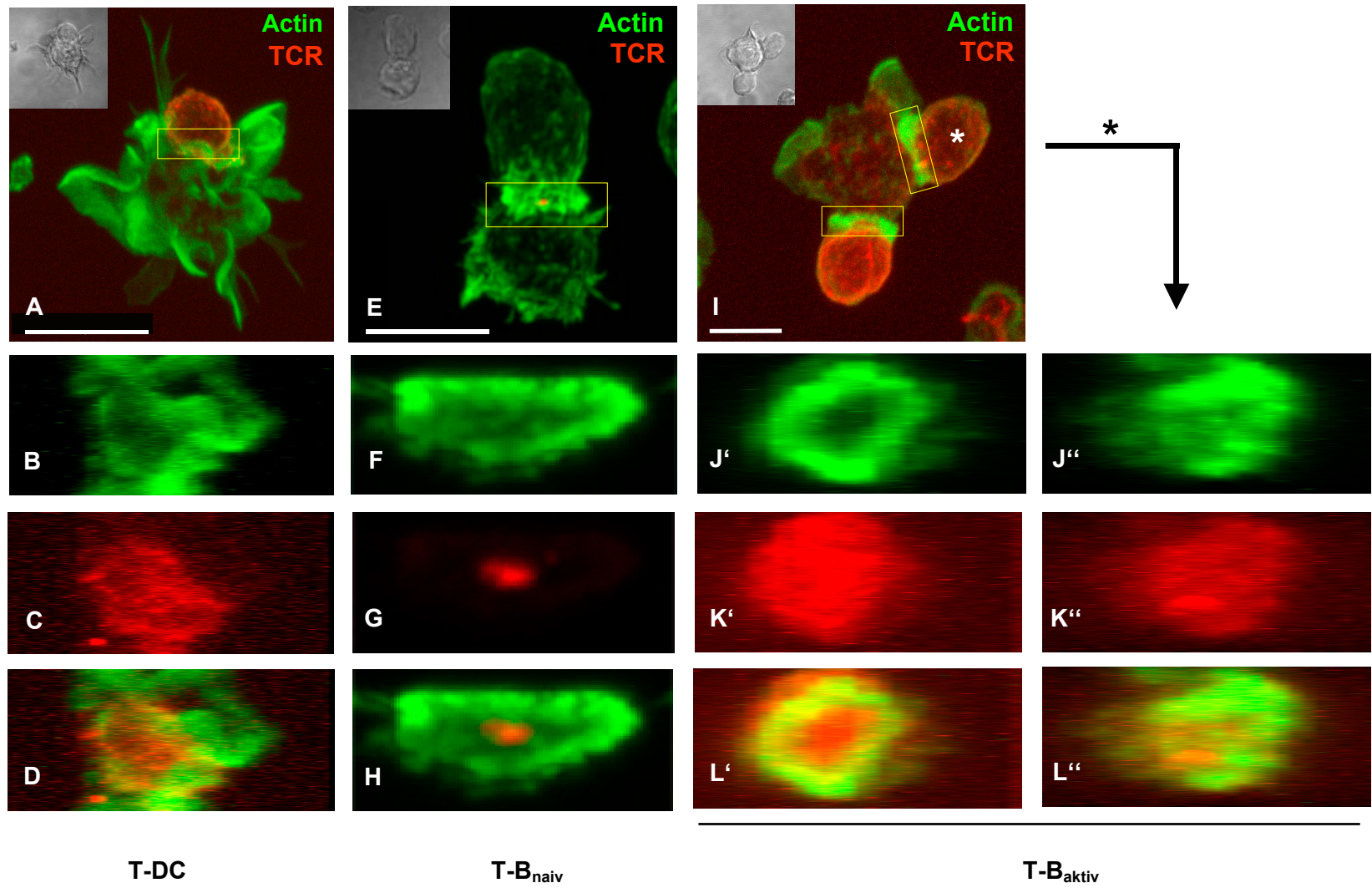
## 4 Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sind in drei Themenkomplexe unterteilt. Zu Beginn werden die Unterschiede in der Formation der Immunologischen Synapse (IS), der Polarisation des Mikrotubuli-organisierenden Zentrums (*microtubule-organizing centre*, MTOC) und der Verteilung des Aktin-Zytoskelettproteins ARP2/3 bei Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven oder aktivierten B-Zellen und bei Kontakten mit reifen Dendritischen Zellen (DCs) vorgestellt. Anschließend werden im zweiten Teil die Effekte von CYTIP-siRNA in DCs bei der Aktivierung von naiven T-Zellen aufgezeigt. Schließlich werden im letzten Teil die Messungen von Kontaktkräften während antigenspezifischer Interaktionen mittels Kraftspektroskopie dargestellt.

### 4.1 Formation einer Immunologischen Synapse bei der Interaktion von naiven T-Zellen mit verschiedenen antigen-präsentierenden Zellen

Bei Interaktionen von T-Zellen mit antigenpräsentierenden Zellen (APC) kommt es bei antigenspezifischer Erkennung zur Ausbildung einer Immunologischen Synapse (IS) mit einer charakteristischen Verteilung von intrazellulären Proteinen und Oberflächenproteinen (Monks et al., 1998). Interaktionen von naiven T-Zellen in Kontakten mit naiven und aktivierten B-Zellen sowie mit DCs wurden fixiert und für Proteine gefärbt, welche charakteristisch für die Ausbildung einer IS sind (T-Zell-Rezeptor und Aktin-Zytoskelett). Anschließend wurden diese Färbungen ausgewertet, um zu untersuchen, welche Interaktionstypen die Ausbildung einer klassischen IS (mit cSMAC-pSMAC-Struktur) aufweisen.

In den Immunfluoreszenzen ist deutlich zu erkennen, dass es in Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen zur Ausbildung einer klassischen IS kam, während diese bei Interaktionen derselben T-Zellen mit reifen DCs oder aktivierten B-Zellen nicht oder nur teilweise gefunden werden konnte (Abb. 4.1). Der T-Zell-Rezeptor (TCR) akkumulierte bei Interaktionen mit naiven B-Zellen mittig innerhalb der Kontaktfläche punktförmig (cSMAC). Diese Anhäufung von TCR wurde umgeben von einem Ring von Aktinfilamenten, welche die Kontaktfläche beider Zellen von Seiten der T-Zelle abschloss (pSMAC).



Für Legende, siehe folgende Seite

Abb. 4.1: **Konfokale Immunfluoreszenz-Aufnahmen von Interaktionen von naiven T-Zellen mit verschiedenen APCs.** Naive DO11.10-T-Zellen wurden isoliert und zwei Stunden mit APCs inkubiert, welche zuvor mit OVA<sub>p</sub> beladen wurden. Anschließend wurden die Zellen fixiert und gefärbt. Interaktion mit reifen DCs (A), naiven B-Zellen (E) und aktivierten B-Zellen (I). Gefärbt wurde für den TCR (KJ1.26-Antikörper, rot) und das Aktin-Zytoskelett (Phalloidin, grün). B-D zeigen optische Ausschnitte der T-DC Interaktionsfläche, F-H die Interaktionsfläche von T-Zellen mit naiven B-Zellen, J-L von T-Zellen mit aktivierten B-Zellen. Nur Kontakte von T-Zellen mit naiven T-Zellen zeigten die Formation einer klassischen cSMAC / pSMAC-IS. Die Aufnahmen sind repräsentativ für n>3 Experimente.

Eine Quantifizierung der gebildeten Synapsen zeigte deutlich, dass mehr als 80% der Interaktionen von naiven T- mit naiven B-Zellen die Bildung einer klassischen IS aufwiesen. Der Anteil an gebildeten Synapsen fiel in Interaktionen mit aktivierten B-Zellen hingegen deutlich auf einen Wert von ca. 25%. Kontakte mit reifen DCs dagegen zeigten zu 95% keine Formation einer klassischen cSMAC-pSMAC-IS (Abb. 4.2).

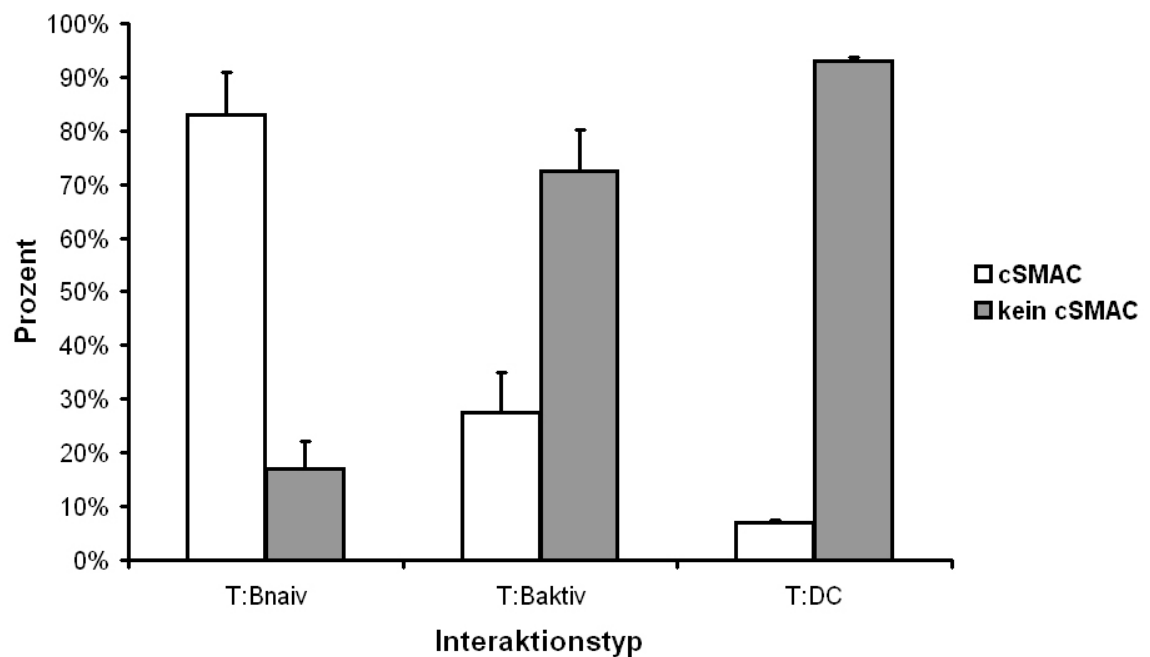


Abb. 4.2: **Quantifizierung von IS in Interaktionen von T-Zellen mit verschiedenen APCs.** Naive DO11.10-T-Zellen wurden für zwei Stunden mit APCs inkubiert, welche mit 100 µg/ml OVA<sub>p</sub> beladen wurden. Die Zellen wurden anschließend fixiert und der TCR mittels KJ1.26-Antikörper gefärbt. Mit einem Epifluoreszenz-Mikroskop wurden der Anteil an gebildeten IS in Interaktionen ausgezählt. Als Indikator für die Ausbildung einer klassischen IS wurde das Vorhandensein eines cSMACs in Form einer punktförmigen T-Zell-Rezeptor-Akkumulation gezählt. Die Daten stehen für n=3 Experimente (naive B-Zellen mit 100 bis > 600 gezählten Zellen) bzw. n=2 Experimente (aktivierte B-Zellen mit >250 Zellen und DCs mit > 400 Zellen).

Bei Titration der Antigen-Beladung zeigte sich ein sichtbarer Effekt auf die IS-Formation nur bei den Interaktionen mit naiven B-Zellen (Abb. 4.3). Während bei aktivierten B-Zellen und DCs der Anteil an gezählten IS weitergehend konstant blieb, zeigten naive B-Zellen eine deutliche Korrelation zwischen Antigen-Beladung und Ausbildung einer klassischen IS.

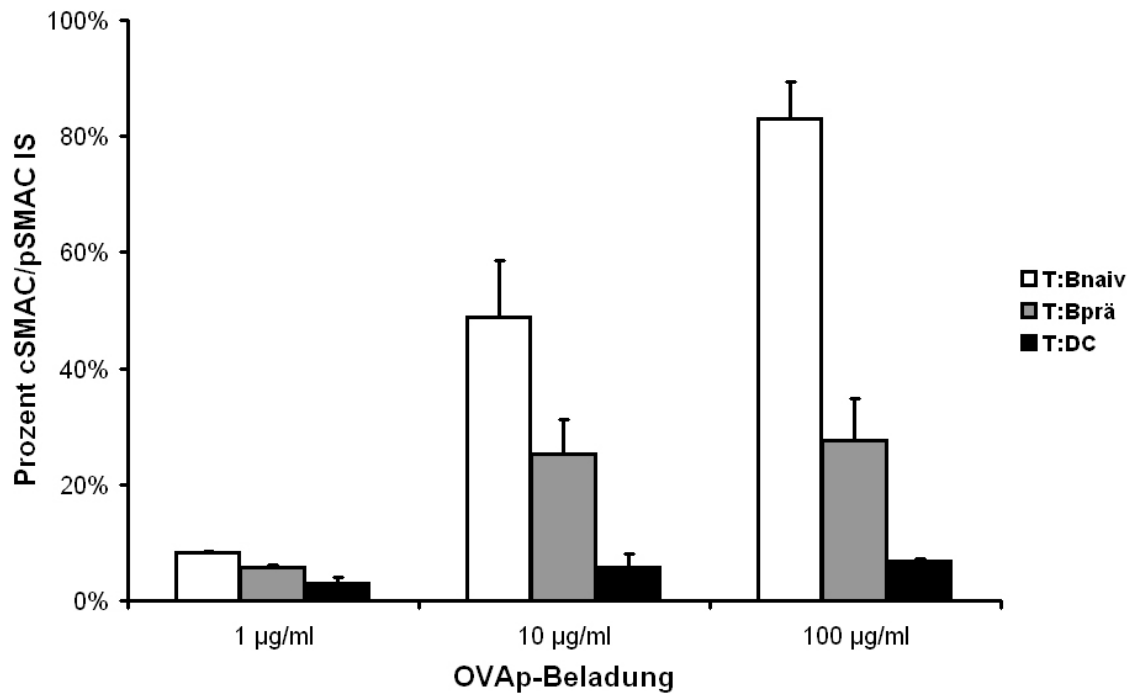


Abb. 4.3: **Abhängigkeit der IS-Formation von der Antigen-Beladung.** Die Versuchsdurchführung erfolgte analog zu Abb. 4.2. Die Beladung der APCs mit OVAp betrug 1 µg/ml, 10 µg/ml und 100 µg/ml. Während naive B-Zellen bei einer Erhöhung der Antigenmenge mehr IS bilden, ist dieser Effekt bei aktivierten B-Zellen nur schwach zu beobachten und tritt bei DCs nicht auf. Die Daten stehen für n=3 Experimente.

Um zu untersuchen, inwieweit die Expression von costimulatorischen Molekülen der B7-Familie (CD80 und CD86) mit der Ausbildung einer klassischen cSMAC-pSMAC-IS korreliert, wurden naive und aktivierte B-Zellen sowie DCs im Durchflusszytometer auf die Expression dieser Moleküle untersucht.

Während naive B-Zellen nur geringe Mengen der costimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 exprimierten, jedoch immer bei Interaktionen eine klassische IS ausbildeten, regulierten sie bei Aktivierung vor allem CD86-Moleküle auf. Gleichzeitig kam es nur noch zu einem geringeren Anteil zur Ausbildung einer IS. Reife DCs schließlich waren stark positiv sowohl für CD80 als auch CD86 auf der Zelloberfläche, jedoch konnte die Formation einer IS in Kontakten mit naiven T-Zellen nicht mehr beobachtet werden (Abb. 4.4).



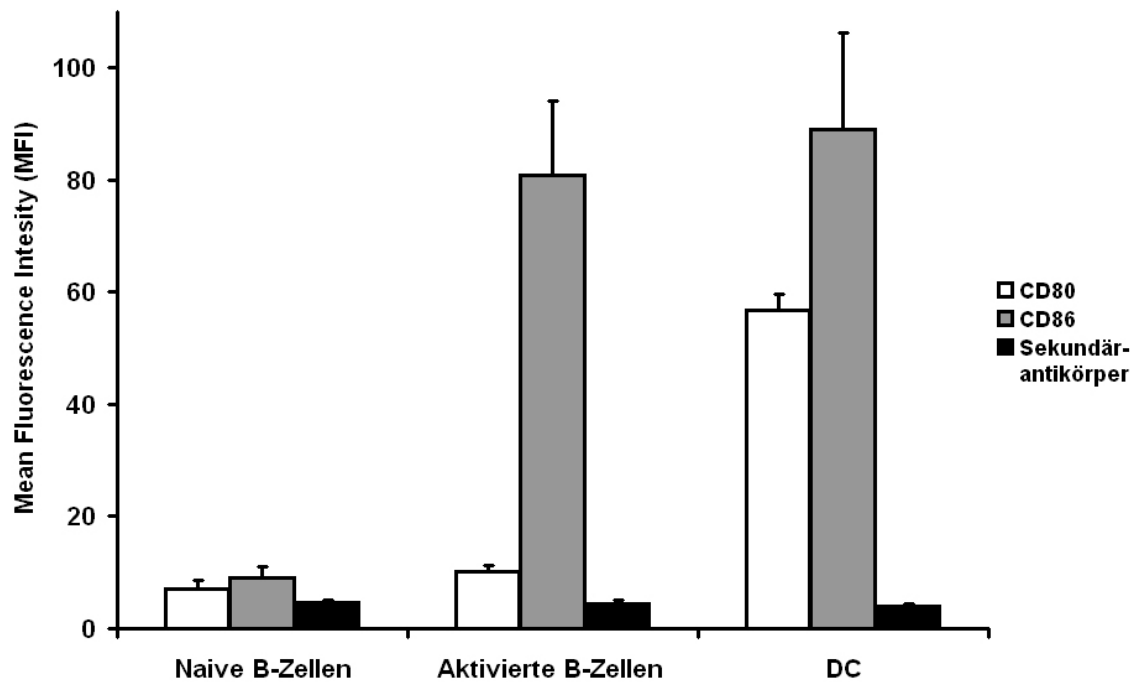


Abb. 4.4: **Expression von costimulatorischen CD80- und CD86-Molekülen auf der Oberfläche von verschiedenen APCs.** Naive B-Zellen exprimierten CD80 und CD86 nur zu einem geringen Anteil, aktivierte B-Zellen regulierten CD86 herauf und reife DCs waren schließlich stark positiv für sowohl CD80- als auch CD86-Moleküle. Die Daten stehen für n=3 Experimente.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Ausbildung einer klassischen IS mit cSMAC-pSMAC-Struktur nur bei Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen erfolgte. Diese IS-Formation war abhängig von der Antigen-Beladung und erhöhte sich mit steigender Antigenmenge. Gleichzeitig exprimierten naive B-Zellen jedoch die geringste Menge an B7-Molekülen auf ihrer Oberfläche und somit korrelierte die Expression von costimulatorischen Molekülen der B7-Familie nicht mit der Bildung einer IS.

Neben der Untersuchung zur TCR-Akkumulation und IS-Formation wurden ebenfalls verschiedene Signalmoleküle der T-Zellaktivierung in Interaktionen angefärbt. Hierbei konnte nur bei Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen für die Signalmoleküle phospho-PKC $\theta$  (pPKC $\theta$ ) und phospho-Tyrosin (pTyr, ein Indikator für die Aktivierung zahlreicher Signalmoleküle) eine Akkumulation in der IS (im cSMAC) gezeigt werden (Abb. 4.5 und Abb. 4.6).

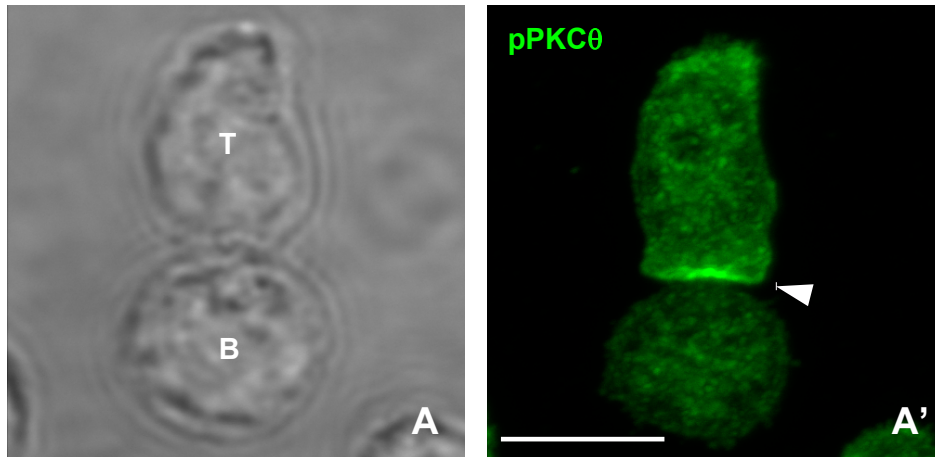


Abb. 4.5: **Akkumulation von phospho-PKCθ (pPKCθ) innerhalb der Kontaktfläche von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen.** Die Interaktionen wurden entsprechend Abb. 4.1 durchgeführt, fixiert und gefärbt. Es ist deutlich die Anreicherung der pPKCθ innerhalb des cSMACs der IS zu erkennen (weißer Pfeil). Durchlicht- (A) und Immunfluoreszenz-Aufnahme (A'). Der weiße Balken entspricht 5 µm.

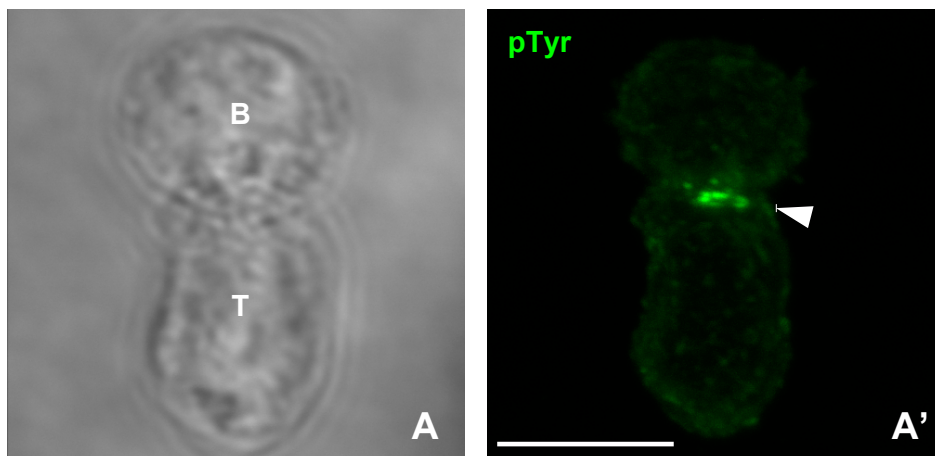


Abb. 4.6: **Akkumulation von phospho-Tyrosin (pTyr) innerhalb der Kontaktfläche von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen.** Die Interaktion wurde entsprechend Abb. 4.1 durchgeführt, fixiert und gefärbt. Es ist deutlich eine Anreicherung von pTyr innerhalb des cSMACs der IS zu erkennen (weißer Pfeil). Durchlicht- (A) und Immunfluoreszenz-Aufnahme (A'). Der Balken entspricht 5 µm.

Die Akkumulation von phospho-ZAP70 (pZAP70) innerhalb der IS in Interaktionen von T-Zellen mit naiven B-Zellen konnte nicht gezeigt werden. Zusätzlich zeigten die Immunfluoreszenzen sowohl bei Interaktionen von naiven T-Zellen mit aktivierten B-Zellen als auch mit DCs keine Anreicherung von pPKCθ, pTyr und pZAP70 innerhalb der Kontaktfläche. Schließlich konnte keine Anreicherung von Talin im pSMAC in Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen gezeigt werden (Daten nicht gezeigt).

## 4.2 Die Struktur des Zytoskeletts bei Interaktionen von T-Zellen mit verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen

Das Erkennen des passenden MHC-Peptid- (MHCp-) Komplexes durch den TCR initiiert eine Signaltransduktionskaskade, welche über verschiedene Proteine mit dem Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskelett verbunden ist. Das Mikrotubuli-Zytoskelett spielt eine wichtige Rolle beim Transport von Vesikeln (z.B. mit Zytokinen) und der Formgebung der Zelle (Stinchcombe et al., 2006; Reichert et al., 2001; Kupfer et al., 1991), während die Interaktion von T-Zellen mit APCs zu einer starken Aktindynamik im Bereich der Kontaktfläche führt, welche eine besondere Funktion bei der TCR-Internalisierung, der Integrin-Aktivierung und Lamellipodien-Formation besitzt (Tskvitaria-Fuller et al., 2003; Pantaloni et al., 2001).

### 4.2.1 Die Struktur des Mikrotubuli-Zytoskeletts

Das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (*microtubule-organizing centre*, MTOC) ist eine Struktur in eukaryotischen Zellen, an denen das Wachstum von Mikrotubuli beginnt. Dabei ist das Minus-Ende der polaren Mikrotubuli stets mit dem MTOC assoziiert. Über Motorproteine können Proteine entlang der Mikrotubuli in beide Richtungen (zum (+) oder zum (-)-Ende) transportiert werden. Bei der Interaktion von CD8<sup>+</sup>-zytotoxischen T-Zellen werden Vesikel mit lytischen Granula transportiert (Stinchcombe et al., 2001; Stinchcombe et al., 2006). Die polarisierte Sekretion von Zytokinen findet jedoch auch bei T-Helferzellen während der Interaktion mit APCs statt (Reichert et al., 2001; Kupfer et al., 1991).

Um die Frage zu klären, ob es Unterschiede in der Polarisation des MTOCs in Interaktionen von naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit verschiedenen APCs gibt, wurden Interaktionen fixiert und die Position des MTOCs untersucht. In migrierenden aktivierten T-Zellen lag das MTOC hinter dem Nukleus am Uropod der sich bewegenden Zelle (Abb. 4.7). Gegenüber ruhenden naiven T-Zellen, welche inaktive abgerundete Zellen waren, zeigten aktivierte T-Zellen eine starke Zytoskelettdynamik und waren sehr motil.

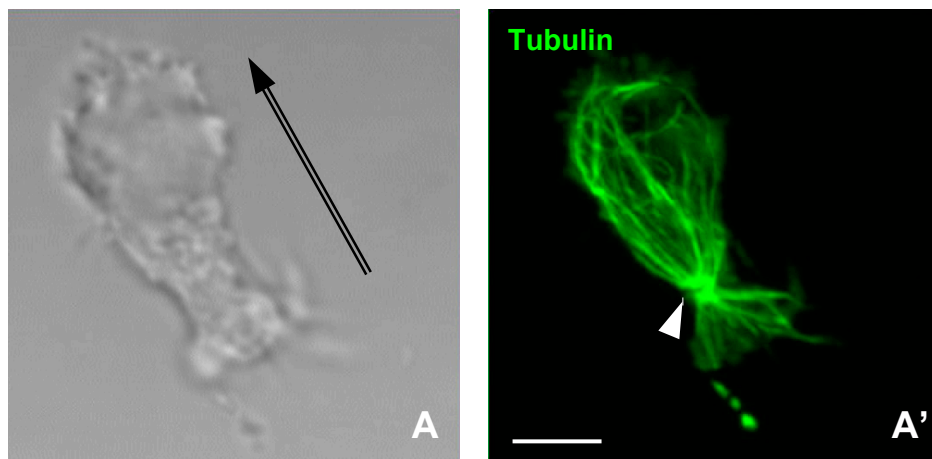


Abb. 4.7: **Struktur des Mikrotubuli-Zytoskeletts in einer aktivierten migrierenden T-Zelle.** Naive T-Zellen wurden drei Tage mittels  $\alpha$ -CD3-Antikörper aktiviert und anschließend auf Deckgläschen gegeben, welche mit Fibronektin beschichtet waren. Nach 30 min wurden die Zellen fixiert und das Mikrotubuli-Zytoskelett angefärbt. Nomarski- (A) und Immunfluoreszenz-Aufnahme (A'). Die Lage des MTOCs ist mit einem weißen Pfeil markiert. Es befindet sich hinter dem Zellkern am Uropod der migrierenden Zelle. Der schwarze Pfeil in A markiert die Migrationsrichtung der T-Zelle. Der Balken entspricht 5  $\mu$ m.

Hingegen kam es bei Interaktion von naiven T-Zellen mit naiven oder aktivierten B-Zellen und DCs immer zur Ausrichtung des MTOCs der T-Zellen zur Kontaktfläche der Interaktion. Zusätzlich polarisierten naive und aktivierte B-Zellen ihr Mikrotubuli-Zytoskelett ebenfalls zur IS hin, während bei DCs das MTOC in der Mitte der Zelle verblieb und nicht zur Kontaktfläche wanderte (Abb. 4.8-10).

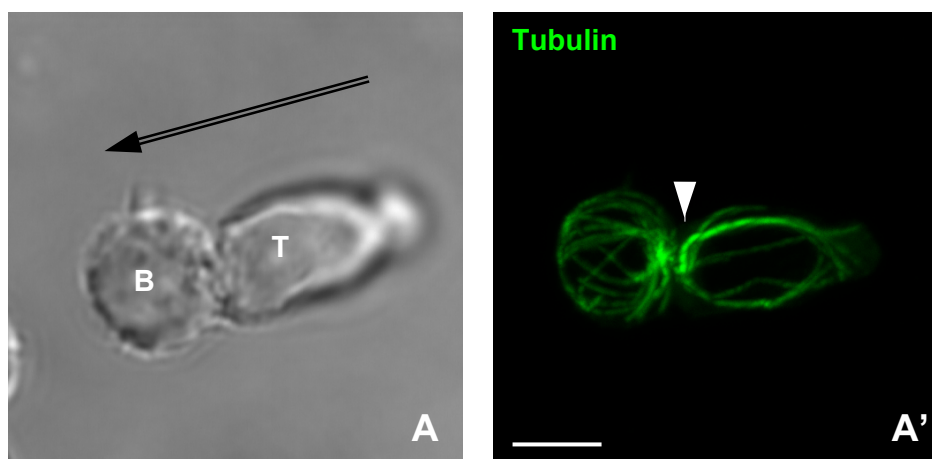


Abb. 4.8: **Polarisation des MTOCs in Interaktion einer naiven T-Zelle mit einer naiven B-Zelle.** T-Zellen interagierten zwei Stunden mit 100  $\mu$ g/ml OVAp-beladenen naiven B-Zellen, wurden auf Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen fixiert und anschließend gefärbt. Das MTOC beider Zellen polarisierte zur Kontaktfläche (weißer Pfeil). Nomarski- (A) und Immunfluoreszenz-Aufnahme (A'). Der schwarze Pfeil in A markiert die Migrationsrichtung der T-Zelle. Der Balken entspricht 5  $\mu$ m.

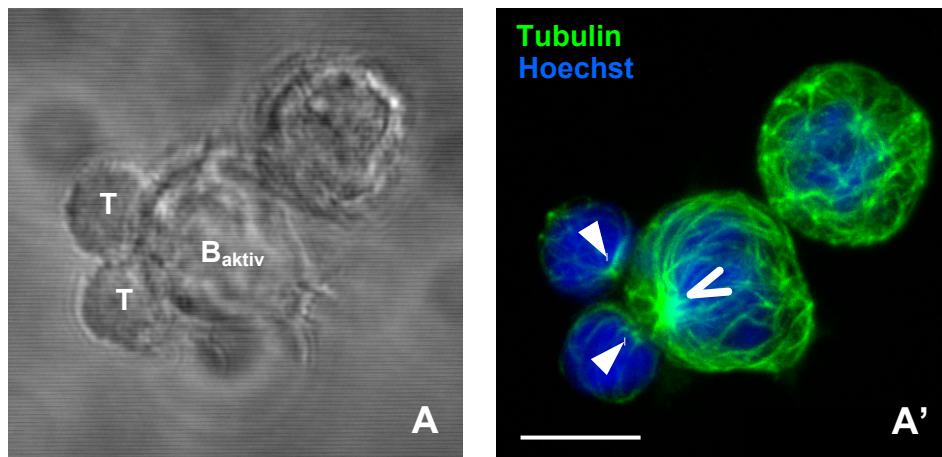


Abb. 4.9: **Polarisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts bei einer Interaktion von zwei naiven T-Zellen mit einer aktivierten B-Zelle.** Naive B-Zellen wurden drei Tage mit naiven T-Zellen und 10 µg/ml OVAp-Beladung co-kultiviert, isoliert und Interaktionen mit frischen naiven T-Zellen entsprechend Abb. 4.8 durchgeführt, fixiert und gefärbt. Zwei Stunden vor Interaktion wurden die aktivierten B-Zellen mit 100 µg/ml OVAp beladen. Das Mikrotubuli-Zytoskelett ist grün dargestellt, die Zellkerne in blau. Das MTOC der aktivierten B-Zelle richtet sich zur Kontaktfläche mit einer T-Zelle aus (geöffneter Pfeil), während beide T-Zellen ihr MTOC zur aktivierten B-Zelle polarisieren (geschlossene Pfeile). Nomarski- (A) und Immunfluoreszenz-Aufnahme (A'). Der Balken entspricht 10 µm.

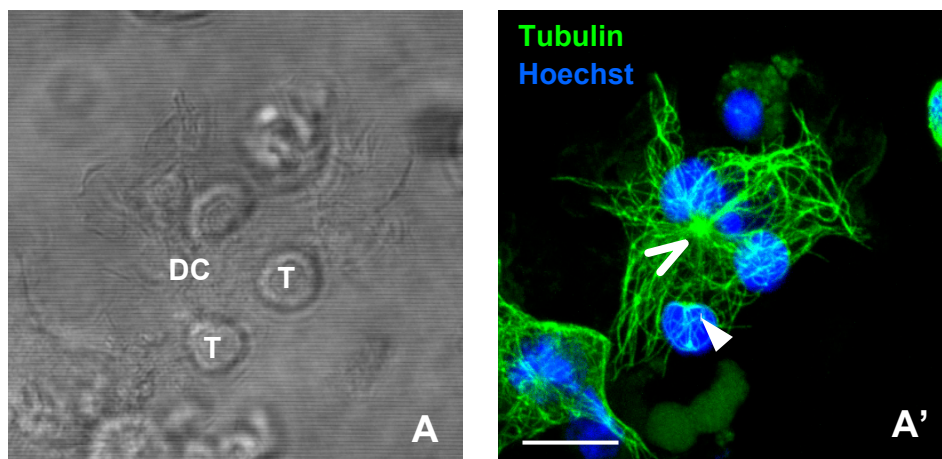


Abb. 4.10: **Interaktion einer DC mit drei naiven T-Zellen.** Die Interaktion wurde entsprechend Abb. 4.8 durchgeführt, fixiert und gefärbt. Die DCs wurden zwei Stunden vor den Interaktionen mit 100 µg/ml OVAp beladen. Während das MTOC der DC in der Mitte der Zelle verbleibt (geöffneter Pfeil), polarisieren die T-Zellen ihr MTOC zur DC hin (weißer Pfeil, exemplarisch für eine T-Zelle). Nomarski- (A) und Immunfluoreszenz-Aufnahme (A'). Der Balken entspricht 10 µm.

Eine Quantifizierung der verschiedenen Interaktionstypen bezüglich der MTOC-Polarisierung ist in Abb. 4.11 zu sehen:

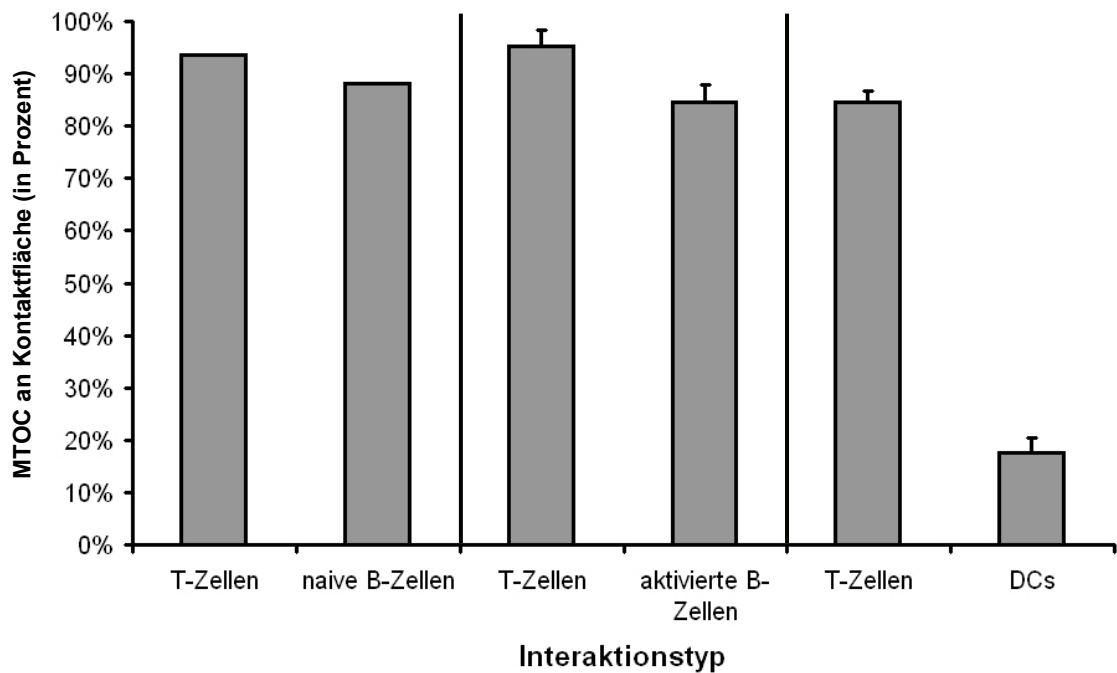


Abb. 4.11: **Quantifizierung der MTOC-Polarisation in Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen, aktivierten B-Zellen und reifen DCs.** Interaktionen von T-Zellen mit verschiedenen APCs wurden fixiert, gefärbt und ausgezählt. Als einziger Zelltyp polarisierte die DC nicht das MTOC zur Kontaktfläche. Während für T-naive B-Zell-Interaktionen ein Experiment mit > 400 gezählten Zellen durchgeführt wurde, stehen die Daten für T-Zell-aktivierte B-Zell-Interaktionen und T-Zell-DC-Interaktionen für n=3 Experimente mit jeweils > 200 gezählten Interaktionen.

#### 4.2.2 Die Struktur des Aktin-Zytoskeletts

Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen zeigen eine starke Dynamik und hohe Motilität, wobei die T-Zelle die B-Zelle aktiv vor sich herschiebt (Gunzer et al., 2004). Die T-Zellen elongieren bei Kontaktaufnahme mit der B-Zelle und zeigen dabei im Bereich der Kontaktstelle eine starke Aktindynamik (vgl. Abb. 4.1E).

Der ARP2/3-Komplex ist ein wichtiger Regulator des Aktin-Zytoskeletts und ermöglicht das Verzweigen von Aktin-Filamenten zu einem Netzwerk (Pantaloni et al., 2001; Disanza et al., 2005; Goley and Welch, 2006). Somit spiegelt die Polarisation des ARP2/3-Komplexes eine hohe Aktivität des Aktin-Zytoskeletts wider. Interaktionen von naiven T-Zellen mit verschiedenen APCs wurden auf die Verteilung des ARP2/3-Komplexes hin untersucht, um Rückschlüsse auf Unterschiede bei der Aktindynamik der T-Zelle und damit die Art der Interaktion ziehen zu können.

Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen zeigten neben der charakteristischen Elongation der T-Zelle eine deutliche Anhäufung des ARP2/3-Komplexes sowohl an der Kontaktfläche der T-Zelle als auch am Uropod (Abb. 4.12). Dagegen war der ARP2/3 einheitlich an der Zellmembran in Membranausstülpungen der B-Zelle verteilt

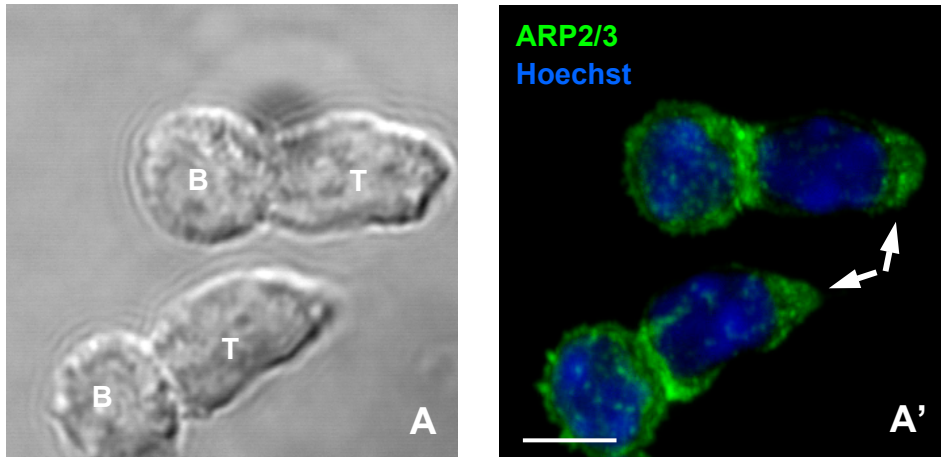


Abb. 4.12: **Verteilung des ARP2/3-Komplexes in Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen.** Die Interaktionen wurden entsprechend Abb. 4.8 durchgeführt, fixiert und gefärbt. Es ist deutlich die Elongation der T-Zellen zu erkennen, wohingegen die B-Zellen abgerundet verbleiben. Neben der deutlichen Akkumulation von ARP2/3 an der Kontaktfläche der T-Zelle, kam es auch zu einer Anreicherung des ARP2/3-Komplexes am Uropod der T-Zelle (weiße Pfeile). Die B-Zellen zeigten keine Polarisation des ARP2/3-Komplexes zur Kontaktfläche, jedoch eine Verteilung von ARP2/3 in Membranausstülpungen, welche sich über die gesamte Zelle erstreckten. Nomarski- (A) und Immunfluoreszenz-Aufnahme (A'). Der Balken entspricht 5  $\mu\text{m}$ .

Hingegen war weder eine Elongation noch eine Bipolarisation des ARP2/3-Komplexes in der T-Zelle bei Interaktionen mit aktivierten B-Zellen oder reifen DCs zu beobachten (Abb. 4.13-14).

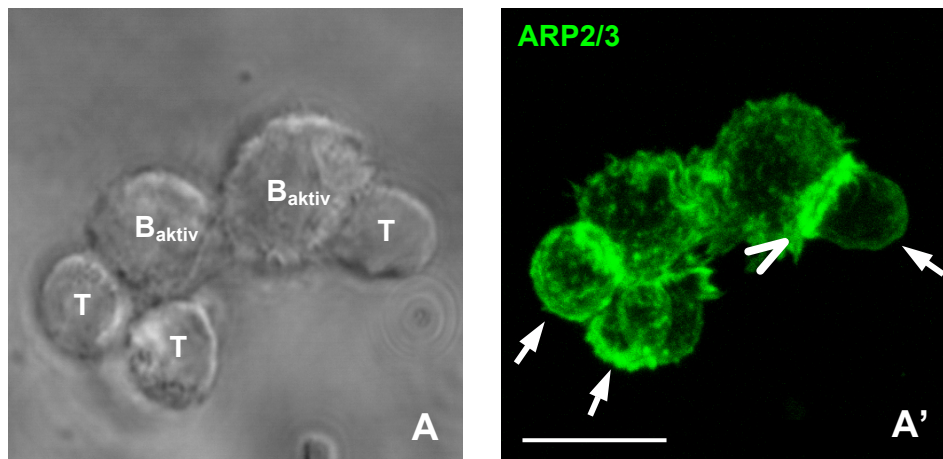


Abb. 4.13: **Verteilung des ARP2/3-Komplexes in Interaktionen von naiven T-Zellen mit aktivierten B-Zellen.** Die Interaktionen und Immunfluoreszenzen wurden entsprechend Abb. 4.8 durchgeführt. Es ist keine ARP2/3-Polarisation am Uropod der T-Zellen zu erkennen (geschlossene Pfeile), jedoch eine ARP2/3-Polarisation an der Kontaktfläche zur aktivierten B-Zelle (geöffneter Pfeil). Nomarski- (A) und Immunfluoreszenz-Aufnahme (A'). Der Balken entspricht 10 µm.

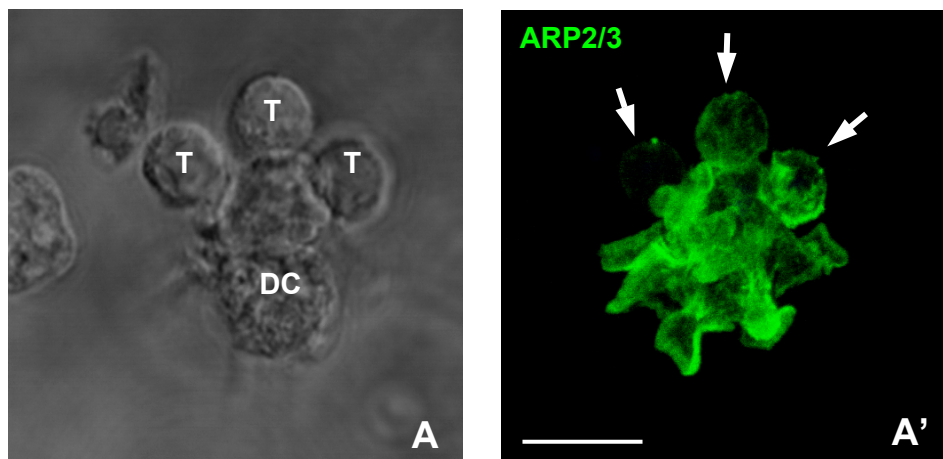


Abb. 4.14: **Verteilung des ARP2/3-Komplexes in Interaktionen von naiven T-Zellen mit einer DC.** Die Interaktionen und Immunfluoreszenzen wurden entsprechend Abb. 4.8 durchgeführt. Es ist keine ARP2/3-Polarisation am Uropod der T-Zellen zu erkennen (weiße Pfeile). Nomarski- (A) und Immunfluoreszenz-Aufnahme (A'). Der Balken entspricht 10 µm.

Mehr als 80% als Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen führten zu einer Elongation der T-Zelle, welche mit einer Bipolarisation des ARP2/3-Komplexes einherging. Bei Interaktionen mit aktivierten B-Zellen zeigten nur rund 20% der T-Zellen diesen Phänotyp. T-Zellen in Kontakt mit einer DC wiesen zu < 10% eine ARP2/3-Bipolarisation auf (Abb. 4.15).



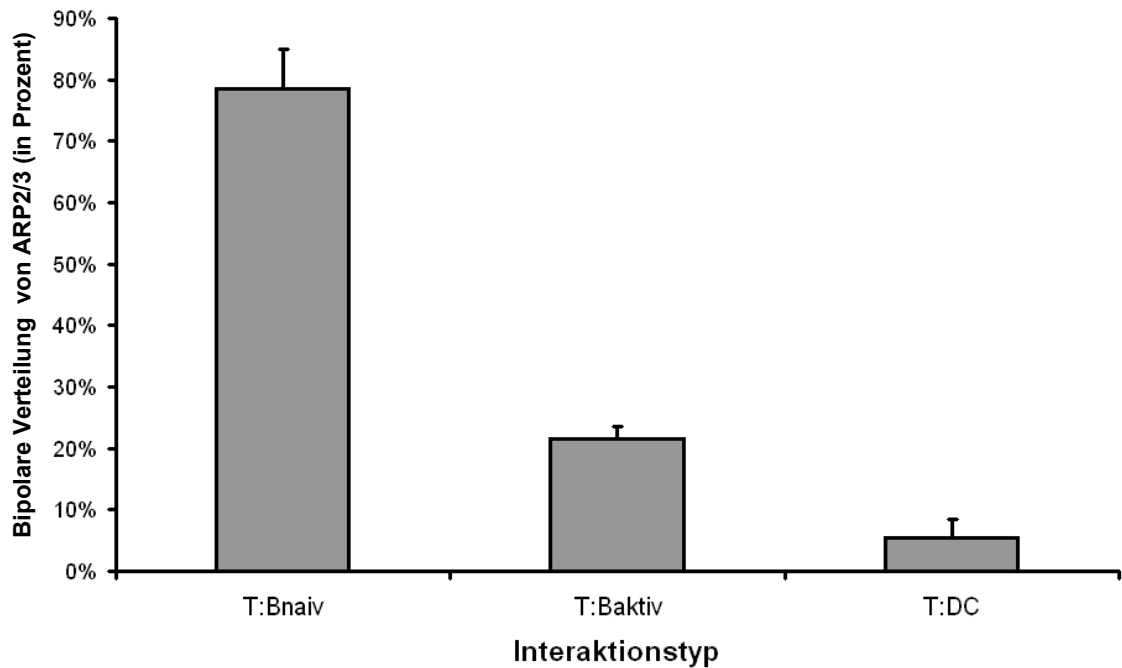


Abb. 4.15: **Bipolare Verteilung des ARP2/3-Komplexes in naiven T-Zellen bei verschiedenen Interaktionstypen.** Interaktionen von T-Zellen mit verschiedenen APCs wurden fixiert, gefärbt und ausgezählt. Lediglich bei Interaktionen von T-Zellen mit naiven B-Zellen polarisierte ARP2/3 sowohl am Uropod als auch an der IS, bei aktivierten B-Zellen und DCs nur an der IS. Die Daten stehen für n=3 Experimente mit > 200 gezählten Zellen.

### 4.3 Effekte von CYTIP-siRNA in DCs auf die Interaktion und Aktivierung von naiven T-Zellen

Wie bereits beschrieben sind die Kontakte zwischen naiven T-Zellen mit DCs oft kurz und sequenziell. Die T-Zellen wandern über die Oberfläche der DC, beenden den Kontakt und nehmen erneut Kontakt mit derselben DC oder einer anderen auf (Gunzer et al., 2000). (Gunzer et al., 2004) konnten zeigen, dass die Interaktionen von T-Zellen mit DCs unabhängig von einer Beteiligung des Integrins LFA-1 an der Adhäsion sind. Hingegen sind die Interaktionen von T-Zellen mit naiven B-Zellen in höchstem Maße von LFA-1 abhängig und eine Blockierung der Aktivierung von LFA-1 in den hochaffinen Zustand z.B. mit dem Imidazolderivat BIRT377 (Kelly et al., 1999) führt zu einer vollständigen Inhibition von antigenspezifischen Zellinteraktionen (Gunzer et al., 2004) zwischen T-Zelle und B-Zelle.

LFA-1 wurde zusätzlich in T-naive B-Zellinteraktionen als essenziell für die Bildung einer klassischen cSMAC-pSMAC-IS beschrieben (Graf et al., 2007).

(Hofer et al., 2006) konnten zeigen, dass siRNA-Knockdown von CYTIP in humanen DCs zu längeren Kontakten mit T-Zellen führt. CYTIP ist ein Interaktionspartner des LFA-1-aktivierenden Proteins Cytohesin-1, welches z.B. in reifen DCs, aber auch in anderen Zellen des Immunsystems vorkommt. Die Bindung von Cytohesin-1 durch CYTIP führt zu einer Translokation ins Zytoplasma, so dass LFA-1 nicht in den hochaffinen Zustand übergehen kann (Boehm et al., 2003). Durch einen CYTIP-Knockdown in DCs kann somit Cytohesin-1 LFA-1 aktivieren. Im humanen System werden als Folge dessen die DCs „klebriger“; hochaffines LFA-1 bindet ICAM-1 auf der Oberfläche der T-Zelle und die Kontakte werden länger (Hofer et al., 2006).

Um diese Befunde aus Interaktionen humaner DCs mit T-Zellen zu bestätigen, wurde an murinen DCs das Protein CYTIP mittels siRNA-Knockdown herunterreguliert und diese DCs anschließend in einem Kollagengel in Kontakt mit naiven T-Zellen gebracht. Die DCs wurden vorher mit OVAp beladen, die T-Zellen wurden mit CFSE gefärbt und als Kontrollansatz wurden DCs verwendet, die mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA elektroporiert wurden. In den Abb. 4.16 und Abb. 4.17 sind Ausschnitte aus Zeitraffer-Aufnahmen von Interaktionen von CYTIP-siRNA-DCs bzw. Kontroll-DCs mit naiven CFSE-gefärbten T-Zellen gezeigt (siehe außerdem Videos auf beiliegender CD). Interaktionen von Kontroll-DCs mit T-Zellen zeigten den charakteristischen Phänotyp mit wiederholten Kontakten und dynamischer Bewegung der T-Zellen auf der Oberfläche der DC (Abb. 4.16). Hingegen zeigten die Interaktionen mit CYTIP-siRNA-DCs lange Kontakte mit T-Zellen, bei denen die T-Zellen zusätzlich bewegungslos an der DC adhärirten (Abb. 4.17). Für den gesamten Zeitraum des Filmes (4,5 Stunden) interagierten die T-Zellen mit den CYTIP-siRNA-DCs, während die Kontakte mit den Kontroll-DCs in diesem Zeitraum dynamisch und wiederholt waren.

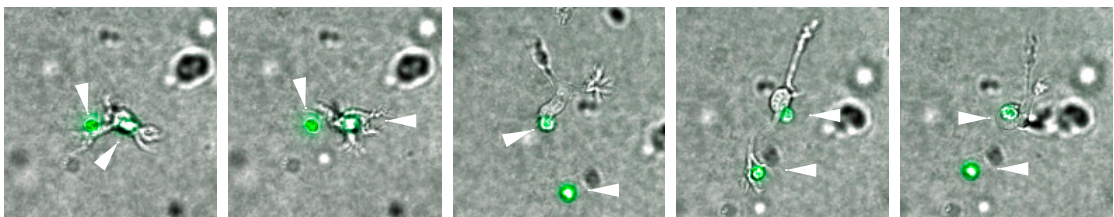


Abb. 4.16: **Interaktionen von T-Zellen mit Kontroll-siRNA-DCs.** Unreife DCs wurden mit 10 µg unspezifischer Kontroll-siRNA elektroporiert, stimuliert, nach 72 Stunden mit 1 µg/ml OVAp beladen und in einem Kollagengel in Kontakt mit naiven T-Zellen gebracht (CFSE markiert, grün). Es ist deutlich die Dynamik der Interaktion zu erkennen. Die T-Zellen wandern auf der Oberfläche der DCs umher, während die Kontakte zusätzlich sequenziell sind. Die Bilder zeigen ausgewählte Ausschnitte aus einem 4,5 Stunden langen Film (zu finden auf beiliegender CD).

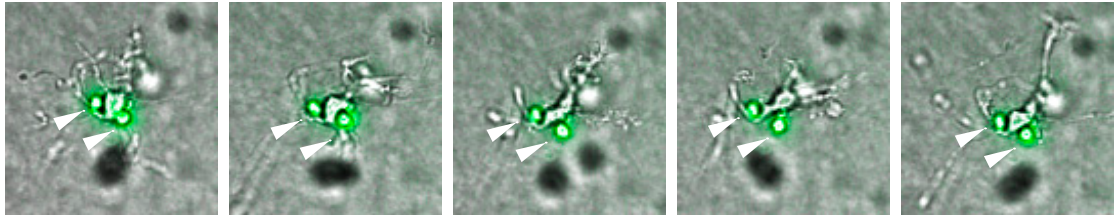


Abb. 4.17: **Interaktionen von naiven T-Zellen mit CYTIP-siRNA DCs.** Unreife DCs wurden entsprechend Abb. 4.16 mit CYTIP-siRNA elektroporiert und in einem Kollagengel mit naiven T-Zellen (CFSE markiert, grün) in Kontakt gebracht. Interaktionen mit CYTIP-siRNA-DCs sind gegenüber den Kontroll-DCs sehr stabil und zeigen keine ausgeprägte Dynamik. Die Bilder zeigen ausgewählte Ausschnitte aus einem 4,5 Stunden langen Film (zu finden auf beiliegender CD).

Im Lichte dieser Ergebnisse war es nun wichtig zu untersuchen, wie sich der Phänotyp dieser durch CYTIP-siRNA-DCs aktivierten T-Zellen darstellt. Dies wurde bisher in der Literatur nicht beschrieben. Im Folgenden werden die Ergebnisse von IS-Statistiken, Proliferations- und Inhibitionsassays und kompetitiven T-Zell-Aktivierungsassays dargestellt. Hierzu wurden unreife DCs mit 10 µg unspezifischer Kontroll-siRNA oder CYTIP-spezifischer siRNA elektroporiert. Nach 24 Stunden wurden diese DCs mit 20 ng/ml LPS stimuliert und nach weiteren 48 Stunden für Experimente eingesetzt. Dazu wurden die DCs für Interaktionen mit DO11.10-CD4<sup>+</sup>-T-Zellen mit 1 µg/ml OVA<sub>p</sub> bzw. 1 nM SIINFEKL-Peptid bei Interaktion mit OT-I-CD8<sup>+</sup>-T-Zellen beladen. Entsprechend der Durchführung für die Darstellung der IS (siehe Abschnitt 4.1) wurden die DCs in Kontakt mit naiven T-Zellen gebracht, anschließend auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen gebracht, mit PFA fixiert und anschließend für eine Auswertung am Epifluoreszenz- oder Konfokalmikroskop gefärbt. Hierbei zeigte sich, dass CYTIP-siRNA-DCs signifikant mehr klassische IS während ihrer Kontakte zu naiven T-Zellen ausbildeten (siehe 4.3.1). Zusätzlich wurden CFSE-gefärbte T-Zellen für Proliferationsassays eingesetzt, um die Fähigkeit der CYTIP-siRNA-DCs zu untersuchen, T-Zellen effektiv zu aktivieren. Dabei konnten keine Unterschiede in der Expression von klassischen Aktivierungsmarkern auf den T-Zellen gefunden werden (siehe 4.3.2). Außerdem wurde die Effektor- oder Regulator-Eigenschaft der durch CYTIP-siRNA-DCs aktivierten T-Zellen in Inhibitionsassays untersucht. Durch CYTIP-siRNA-DC aktivierte T-Zellen verhielten sich in diesen Versuchen gegenüber den Kontroll-siRNA-DC aktivierten T-Zellen gleich (siehe 4.3.2). Abschließend wurde die Fähigkeit der CYTIP-siRNA-DCs untersucht, in Kooperation mit Kontroll-siRNA-DCs naive CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zu aktivieren. Hier verhielten sich die DCs in den spezifischen und den Kontroll-Ansätzen gleichermaßen normal. Der Knockdown von CYTIP schien somit für murine DCs redundant und kompensierbar zu sein.

### 4.3.1 CYTIP-siRNA-DCs zeigten eine erhöhte IS-Formation mit naiven T-Zellen

Unreife DCs wurden am Tag 6 mit 10 µg siRNA (CYTIP oder Kontroll-siRNA) elektroporiert, anschließend bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Inkubator weiterinkubiert und nach 24 oder 48 Stunden mit LPS stimuliert. 72 Stunden nach der Elektroporation (EP) wurden die reifen DCs schließlich für Versuche eingesetzt und für Western Blot-Analyse Zell-Lysate hergestellt. Für einen erfolgreichen Proteinknockdown war es wichtig die Medien für die EP auf Raumtemperatur zu erwärmen, die Zellen nach erfolgter EP unverzüglich aus der Küvette in eine Petrischale mit warmem Medium zu überführen und in den CO<sub>2</sub>-Inkubator zu stellen. Eine EP mit anschließendem längerem Transport der Zellen erwies sich als nicht geeignet für einen Proteinknockdown.

In Abb. 4.18 ist eine Western Blot-Analyse des CYTIP Knockdowns 72 Stunden nach EP mit entsprechender Aktin-Kontrolle gezeigt.

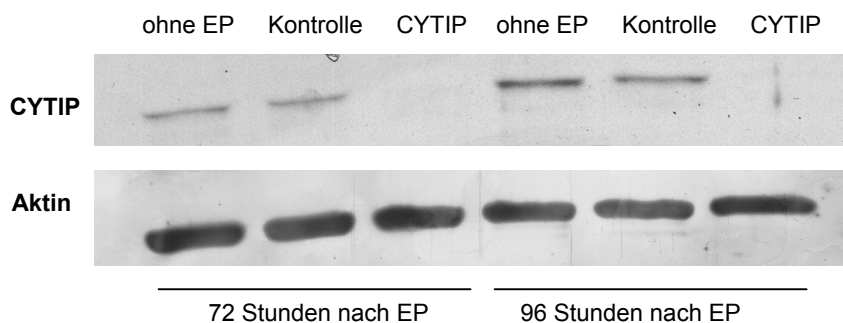


Abb. 4.18: **CYTIP Knockdown mittels siRNA 72 und 96 Stunden nach Elektroporation (EP) in DCs.** Unreife DCs wurden mit 10 µg Kontroll- bzw. CYTIP-siRNA elektroporiert. Nach LPS-Stimulation wurden die Zellen lysiert und 20 µg Protein für den Western Blot eingesetzt. Als Ladekontrolle wurde der Nachweis von Aktin durchgeführt. Der Blot wurde mithilfe von Jessica Nickel am LIMES-Institut in Bonn durchgeführt. Äquivalente Knockdown-Ergebnisse wurden in eigenen Experimenten erreicht.

Naive, frisch isolierte T-Zellen wurden mit OVAp-beladenen CYTIP-siRNA-DCs für zwei Stunden in Kontakt gebracht und die Interaktionen fixiert. Anschließend wurden die Zellpaare mit Phalloidin und dem DO11.10-TCR-spezifischen Antikörper KJ1.26 gefärbt und die Formation einer klassischen IS bei Kontroll-Interaktionen und CYTIP-siRNA-Interaktionen entsprechend den Daten in Abb. 4.2 quantifiziert. Zusätzlich wurden die gefärbten Zellpaare mithilfe konfokaler Laser-Scanning Mikroskopie auf das Vorhandensein einer IS untersucht.

Interessanterweise zeigten die Interaktionen von CYTIP-siRNA-DCs mit T-Zellen eine leicht, jedoch signifikant erhöhte Formation einer klassischen IS gegenüber den Interaktionen von Kontroll-siRNA-DCs (Abb. 4.19).

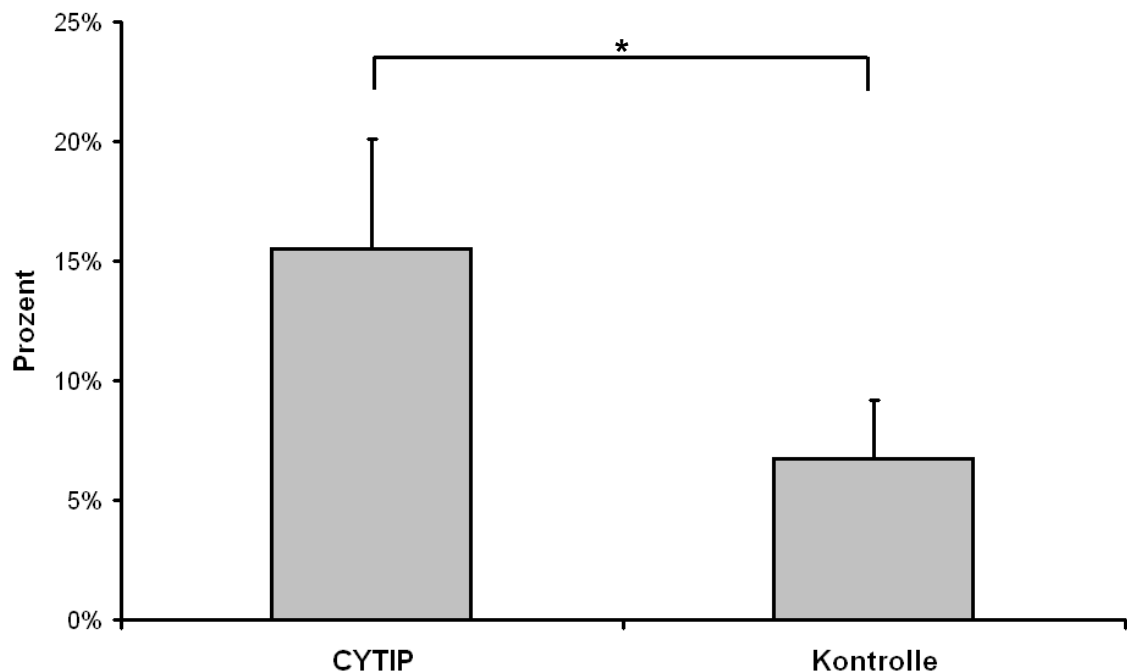


Abb. 4.19: **Erhöhte Bildung einer klassischen IS in Interaktionen von CYTIP-siRNA-DCs mit naiven T-Zellen.** Interaktionen von naiven T-Zellen mit CYTIP-siRNA- und Kontroll-DCs wurden entsprechend Abb. 4.2 durchgeführt, fixiert und gefärbt. Anschließend wurde die Formation einer IS quantifiziert. Die Daten stehen für n=4 Experimente mit jeweils > 100 gezählten Zellen, die Auswertung erfolgte mittels Students t-Test. Die Unterschiede in der Formation in der IS-Formation sind signifikant ( $p = 0,02$ ).

Die Bildung einer cSMAC-IS in Kontakten zwischen CYTIP-siRNA-DCs und naiven T-Zellen konnte ebenfalls in Immunfluoreszenzen, die mittels konfokaler Laser Scanning Mikroskopie untersucht wurden, gezeigt werden (Abb. 4.20).

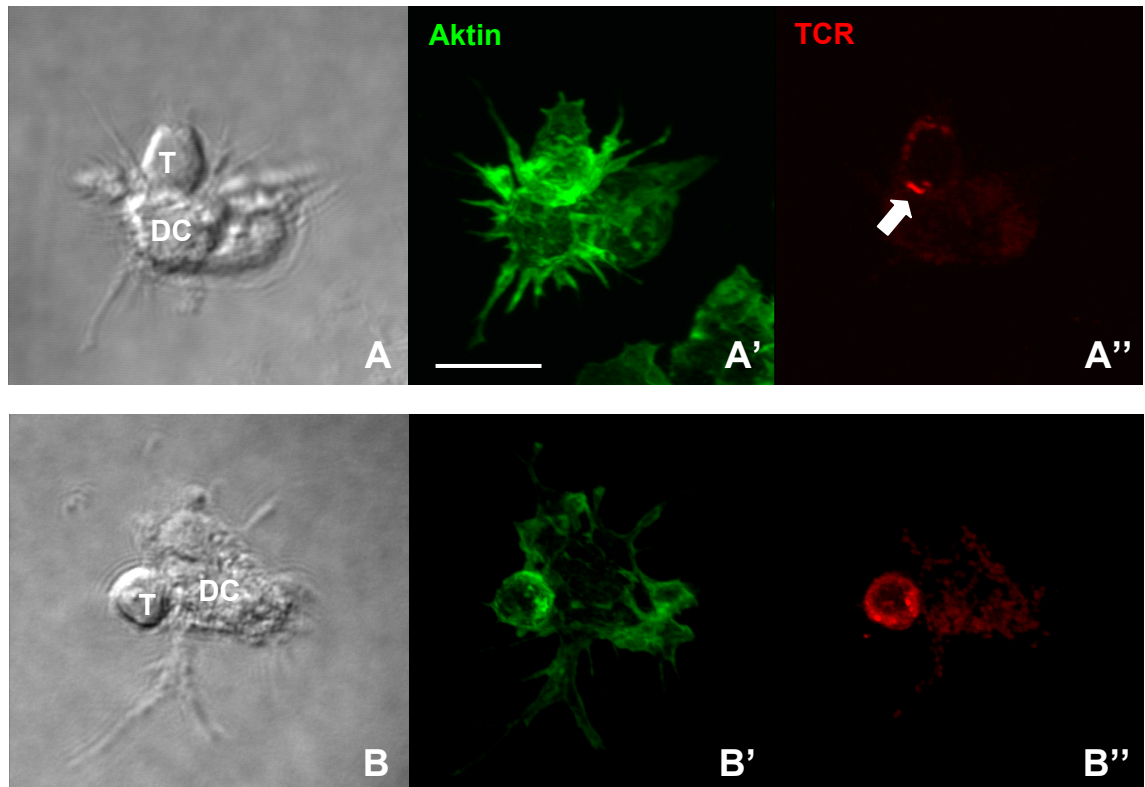


Abb. 4.20: **Bildung einer IS in T-Zell-CYTIP-siRNA-DCs-Kontakten.** Zellinteraktionen wurden entsprechend Abb. 4.1 durchgeführt, fixiert und gefärbt. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie-Aufnahmen von naiven T-Zellen im Kontakt mit CYTIP-siRNA-DCs (A) und Kontroll-siRNA-DCs (B). In A und B sind Nomarski-Aufnahmen der Interaktionen zu sehen, A' und B' zeigen Phalloidin-Färbungen des Aktin-Zytoskeletts und in A'' und B'' ist die Färbung des TCR dargestellt. Es ist deutlich die TCR-Akkumulation an der Kontaktfläche zwischen T-Zelle und CYTIP-siRNA-DC zu erkennen (weißer Pfeil). In Interaktionen von T-Zellen mit Kontroll-siRNA-DCs ist eine derartige IS deutlich seltener zu finden. Diese Färbungen und die Auswertung, sowie die IS-Statistik in Abb. 4.19 wurden in Zusammenarbeit am LIMES-Institut in Bonn, AG Waldemar Kolanus durchgeführt. Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

Diese Experimente zeigten, dass es bei Interaktionen von naiven T-Zellen mit DCs, in denen das Protein CYTIP mittels siRNA herunterreguliert wurde, signifikant häufiger zur Bildung einer IS kam.

#### 4.3.2 Durch CYTIP-siRNA-DC aktivierte T-Zellen zeigen keine regulatorischen Eigenschaften

Während antigenspezifische Kontakte mit DCs zu einer Aktivierung von naiven T-Zellen zu T-Effektorzellen führen, konnten wir zeigen, dass Kontakte mit naiven B-Zellen dieselben T-Zellen auf eine andere Weise aktivieren (Reichardt et al., 2007). Nach dreitägiger Co-Kultur von naiven T- und B-Zellen zeigen B-Zell-aktivierte T-Zellen im Vergleich zu DC-aktivierten T-Zellen ein anderes Expressionsmuster des Aktivierungs-

markers CD62L auf der Zelloberfläche. Während T-Zellen nach Kontakt mit DCs ihr CD62L auf der Oberfläche herunterregulieren, behalten sie es im Kontakt mit naiven B-Zellen weiterhin hochreguliert. Die Expression von CD25 und CD69 verhält sich hingegen in beiden Fällen normal. Diese durch naive B-Zellen aktivierten T-Zellen (im folgenden „T of B“ genannt, analog dazu „T of DC“ für durch DCs aktivierte T-Zellen) besitzen nun die Eigenschaft, frisch isolierte naive T-Zellen in einem Inhibitionsassay in einer kontaktabhängigen Art an ihrer Aktivierung durch DCs zu hindern.

Wie in Abbildung 4.1 gezeigt, aktivierten naive B-Zellen naive T-Zellen in langen, LFA-1 abhängigen Kontakten, bei denen es zur Ausbildung einer klassischen IS kam. Die aktivierten T-Zellen besaßen einen regulatorischen Phänotyp, welcher durch das Beibehalten des Oberflächenmoleküls CD62L gekennzeichnet war (Reichardt et al., 2007). CYTIP-siRNA-DCs zeigten durch den Knockdown längere Kontakte mit naiven T-Zellen (Hofer et al., 2006). Diese Kontakte wiesen gegenüber der Kontrollgruppe zusätzlich eine erhöhte Formation einer klassischen IS auf. Somit stellte sich die Frage, ob der Phänotyp der durch CYTIP-siRNA-DC-aktivierten T-Zellen ebenfalls regulatorischen Charakters war.

Um dies zu untersuchen wurden naive T-Zellen 72 Stunden mit CYTIP-siRNA- oder Kontroll-siRNA-DCs co-kultiviert, anschließend isoliert, für eine Auswertung von Aktivierungsmarkern im FACS gefärbt und für Inhibitionsassays eingesetzt. Als Positivkontrolle wurden „T of B“-Zellen eingesetzt, also naive T-Zellen, welche durch 72stündige Co-Kultur mit naiven B-Zellen aktiviert wurden. Zusätzlich wurden DCs eingesetzt, welche mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA transfiziert wurden.

Die durch CYTIP-siRNA-DCs aktivierten T-Zellen zeigten keine Unterschiede in der Expression von Aktivierungsmarkern gegenüber den Kontroll-T-Zellen. CD25 und CD69 wurden wie erwartet heraufreguliert (Abb. 4.21). Der „T of B“-Zell-Marker CD62L hingegen wurde ebenfalls herunterreguliert (Abb. 4.22).

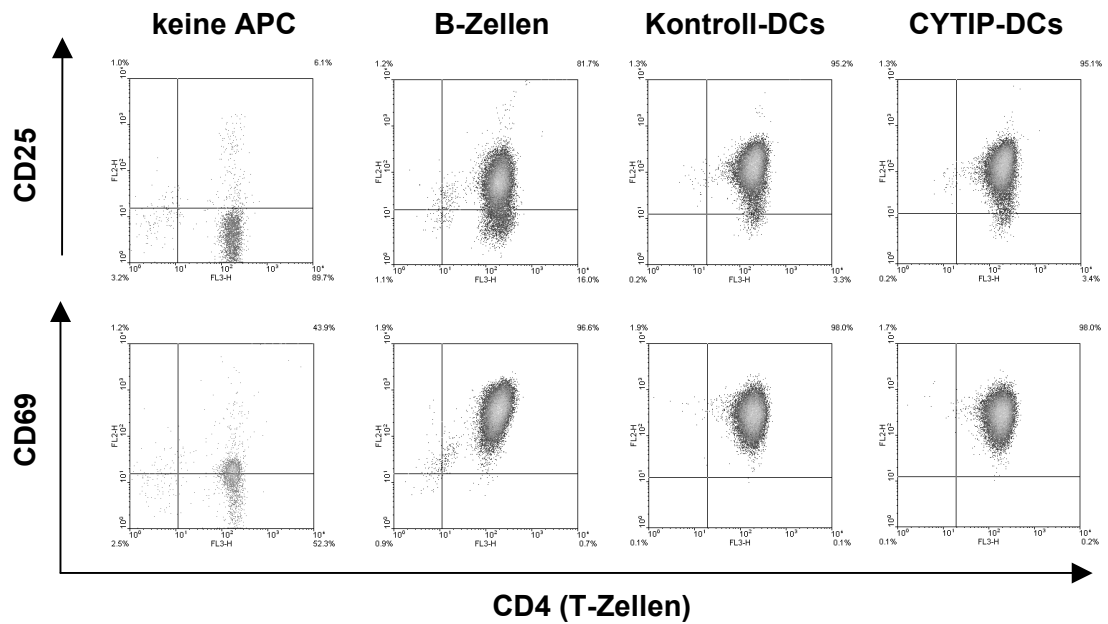


Abb. 4.21: **Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 auf aktivierten T-Zellen.** Naive T-Zellen wurden drei Tage mit beladenen naiven B-Zellen oder reifen DCs inkubiert (Kontroll- oder CYTIP-siRNA, Beladung in allen Ansätzen 10 µg/ml OVAp). Anschließend wurden die aktivierten T-Zellen isoliert, gefärbt und auf die Expression der Aktivierungsmarker CD25 und CD69 im Durchflusszytometer untersucht. Die Expression der Aktivierungsmarker ist bei allen drei Aktivierungsansätzen dieselbe.

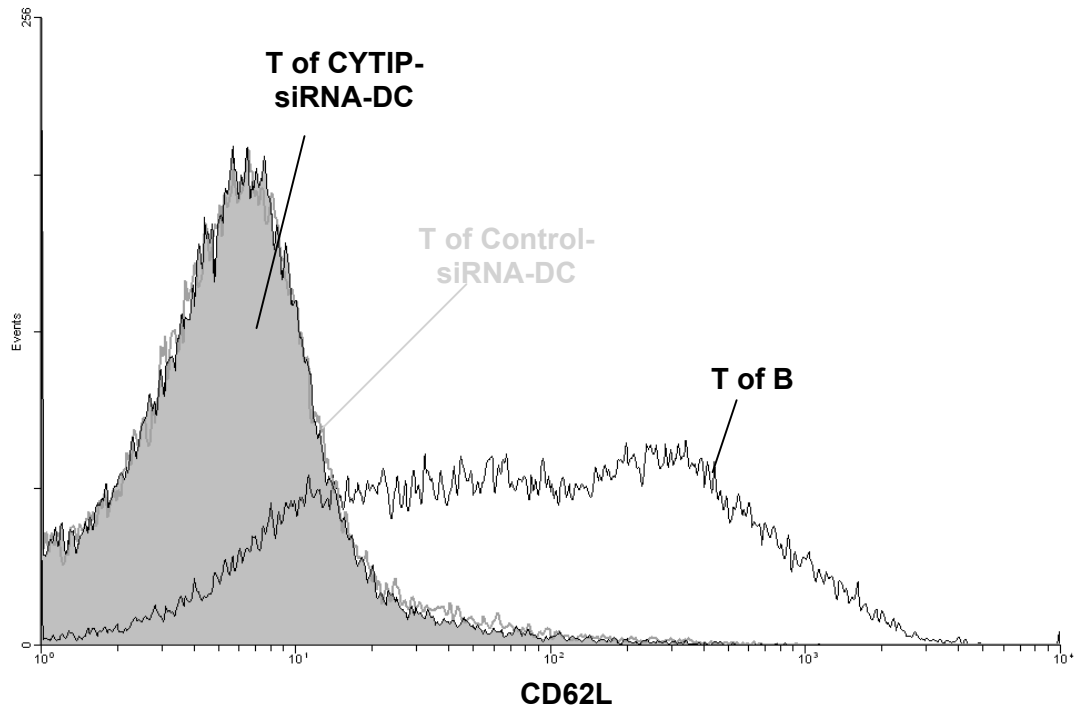


Abb. 4.22: **Expression des Aktivierungsmarkers CD62L auf der Oberfläche von aktivierten T-Zellen.** Naive T-Zellen wurden entsprechend Abb. 4.21 aktiviert, isoliert und ausgewertet. Das Histogramm der Expression von CD62L zeigt, dass TofB-Zellen CD62L weiterhin exprimierten, während TofCYTIP-DC-Zellen und Kontroll-siRNA-aktivierte T-Zellen CD62L herunterregulierten.



Mit den „T of CYTIP-siRNA-DC“-Zellen wurden ebenfalls Inhibitionsassays durchgeführt, um zu untersuchen, welche Eigenschaften diese Zellen auf die Aktivierung von naiven T-Zellen in Co-Kultur haben. Als Positivkontrolle wurden „T of B“-Zellen eingesetzt, welche die Aktivierung von naiven T-Zellen durch DCs inhibieren.

Nach 72 Stunden Co-Kultur zeigten die „T of CYTIP-siRNA-DC“-Zellen keine inhibierenden Eigenschaften, so dass die naiven T-Zellen normal aktiviert wurden und entsprechend in Proliferation gingen. Die naiven T-Zellen, welche hingegen mit „T of B“-Zellen co-kultiviert wurden, wiesen eine Inhibition der Proliferation auf (Abb. 4.23).

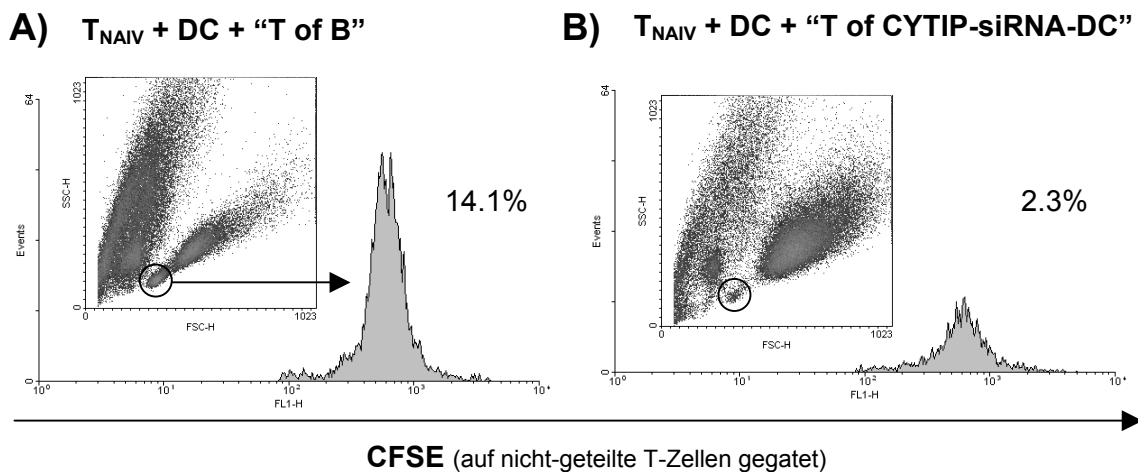


Abb. 4.23: Inhibitionsassay mit „T of B“-Zellen und „T of CYTIP-siRNA-DC“-Zellen. Es wurden die nicht-proliferierenden Zellen markiert und der Anteil angezeigt. Es ist deutlich zu sehen, dass im Ansatz mit „T of B“-Zellen (A) wesentlich mehr Zellen nicht proliferierten als im „T of CYTIP-siRNA-DC“-Zellen-Ansatz (B).

In (Hofer et al., 2006) wurde beschrieben, dass humane DCs, in denen CYTIP mittels siRNA herunterreguliert wurde, Nachteile in der T-Zellaktivierung aufweisen. Mischungen von CYTIP-siRNA- und Kontroll-DCs, in denen nur ein Teil der DCs mit entsprechendem Antigen beladen wurden, zeigten eine deutlich schwächere Expansion von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, als die jeweiligen Ansätze für sich. Somit besaßen CYTIP-siRNA-DCs einen Nachteil in der Konkurrenz mit Kontroll-siRNA in der Fähigkeit T-Zellen zu aktivieren. Ausgehend von diesen Befunden wurde untersucht, ob das erwähnte System von humanen DCs und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen ebenfalls auf murine DCs und CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen übertragbar war.

Es wurden teilweise beladene CYTIP-siRNA- und Kontroll-siRNA-DCs in verschiedenen Verhältnissen gemischt, um zu bewerten, ob der CYTIP-Knockdown Beeinträchtigungen der T-Zell-Aktivierung von sowohl CD4- und CD8-T-Zellen in

Kompetition mit Kontroll-DCs mit sich bringt (Abb. 4.24). Zusätzlich wurde eine Allo-Reaktion mit C57Bl/6-wt-DCs durchgeführt.

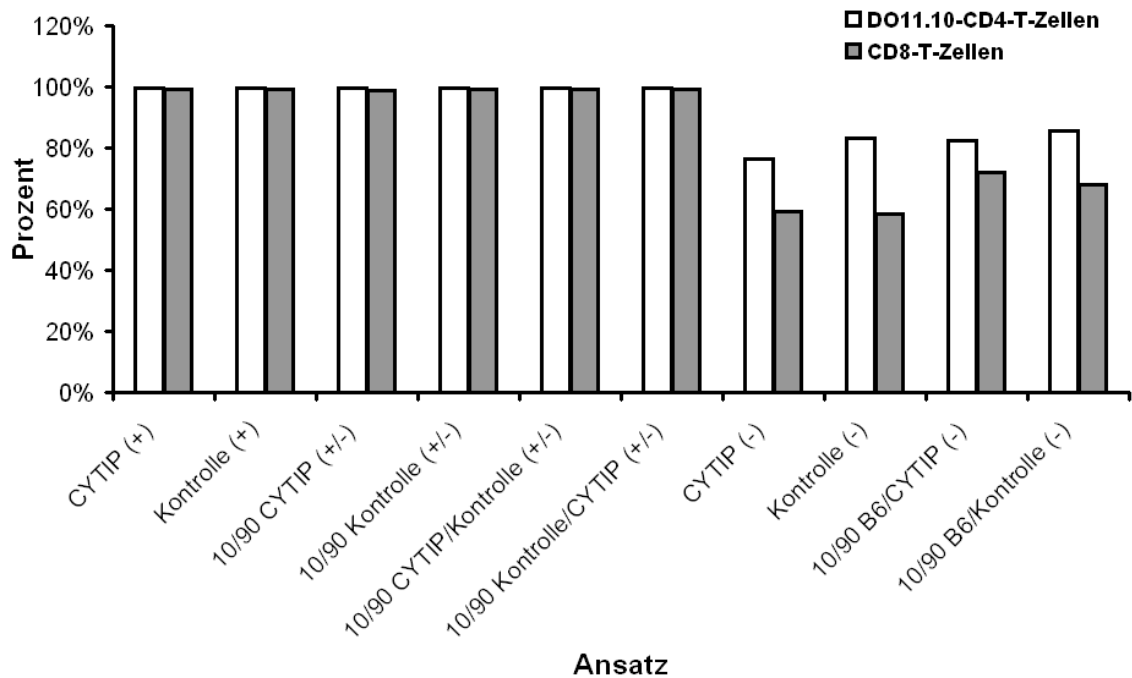


Abb. 4.24: **T-Zell-Aktivierung durch CYTIP-siRNA-DCs.** Naive T-Zellen wurden isoliert, CFSE gefärbt und mit DCs im Verhältnis 10:1 gemischt. Bei den DCs handelte es sich um CYTIPsiRNA, Kontroll-siRNA- oder C57Bl/6-DCs. Angegeben ist die Beladung mit Antigen [(+) für OVAp-Beladung, (-) ohne Beladung, (+/-) für teilweise Beladung) und das Verhältnis von beladenen und unbeladenen bzw. CYTIP-siRNA- mit Kontroll-DCs. Angegeben ist der Anteil an proliferierten T-Zellen nach 72 Stunden. Es ist keine Beeinträchtigungen der T-Zell-Aktivierung durch CYTIP-siRNA-DCs in den verschiedenen Ansätzen zu erkennen.

Zusammenfassend ließen sich bei unseren Experimenten bezüglich des LFA-1-Regulators CYTIP folgende Beobachtungen machen:

- In Interaktionen von CYTIP-siRNA-DCs mit naiven T-Zellen kam es signifikant häufiger zur Bildung einer IS.
- Die Aktivierung der T-Zellen bei diesen Interaktionen unterschied sich nicht von derjenigen bei der Interaktionen mit Kontroll-DCs.
- In Inhibitionsassays zeigten durch CYTIP-siRNA-DCs-aktivierte T-Zellen keine regulatorischen Eigenschaften (gegenüber durch naive B-Zellen-aktivierte T-Zellen).
- CYTIP-siRNA-DCs wiesen keine abgeschwächte Fähigkeit auf, naive T-Zellen in der Konkurrenz mit Kontroll-DCs zu aktivieren.

#### 4.4 Kraftspektroskopie von antigenspezifischen Interaktionen

Die Interaktionstypen von T-Zellen mit verschiedenen APCs zeigen neben der Formation einer IS zusätzlich Unterschiede, welche bspw. die Aktivierung der T-Zelle oder die Kontaktzeiten betreffen. In (Gunzer et al., 2004) wurde beschrieben, dass die Kontakte mit DCs zwar nur kurz und sequenziell sind (im Minutenbereich), jedoch ausreichen für eine vollständige Aktivierung der T-Zelle zur T-Effektorzelle. Hingegen sind die Kontakte mit naiven B-Zellen stundenlang, führen jedoch nicht zur gleichen Aktivierung der T-Zelle wie die Kontakt mit DCs. Darüber hinaus sind diese Kontakte überaus stabil und bleiben auch bei Migration durch ein 3D-Kollagengel oder *in vivo* erhalten.

Es stellte sich die Frage, welche Kräfte zwischen den verschiedenen Interaktionstypen (T-naive B-Zelle und T-DC) wirken. Hierzu wurde Kraftspektroskopie verwendet, welche eine Erweiterung der Rasterkraftspektroskopie (*atomic force microscopy*, AFM) darstellt (Binnig et al., 1986; Rief et al., 1997). Hiermit können über eine funktionalisierte Blattfeder (Cantilever) Kräfte im pN-Bereich gemessen werden. Dazu werden mit dem Cantilever die zu untersuchenden Proben in Kontakt gebracht und anschließend wieder getrennt. Die Steuerung erfolgt über ein Piezo-Element und die Darstellung der gemessenen Kräfte für eine Auswertung in Kraftabstandskurven (siehe 3.16).

Mittels Kraftspektroskopie sollte nun untersucht werden, wie stark die Interaktionen zwischen lebenden T-Zellen und APCs sind. Hierzu wurde eine naive T-Zelle an den Cantilever eines AFMs geklebt, während mit OVAp-beladene naive B-Zellen oder DCs auf einer Petrischale mit Poly-L-Lysin fixiert wurden. Anschließend wurden unter verschiedenen Bedingungen Kontakte herbeigeführt und die Kräfte zwischen den Zellen bei Trennung gemessen (siehe dazu 3.16). Für das Festkleben der T-Zellen an den Cantilever wurde dieser mit einem CD43-Antikörper beschichtet. CD43 ist ein klassischer Uropod-Marker für naive T-Zelle während Interaktion mit z.B. naiven B-Zellen (Abb. 4.25) oder für aktivierte T-Zellen während Migration auf bspw. Fibronectin (Abb. 4.26, (Stoll et al., 2002)).

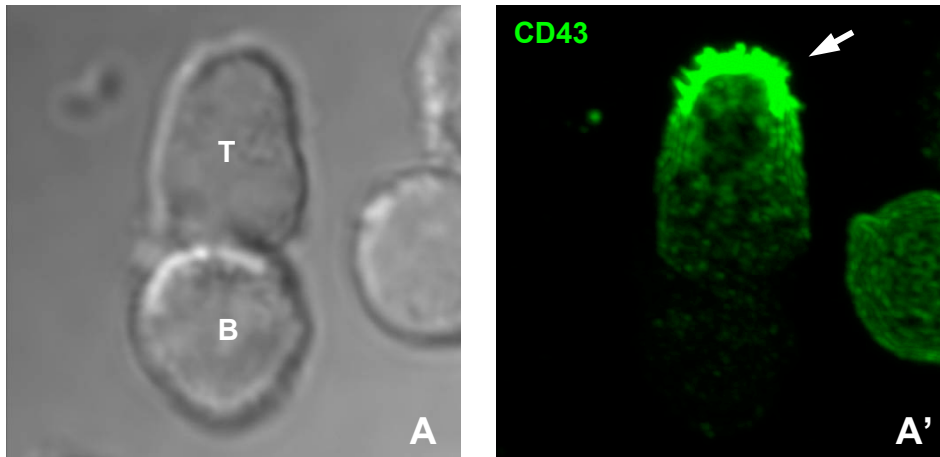


Abb. 4.25: **Verteilung von CD43 bei Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen.** Die Interaktionen wurden entsprechend Abb. 4.8 durchgeführt, fixiert und gefärbt. Es ist deutlich zu erkennen, dass CD43 während der Interaktion am Uropod der naiven T-Zellen akkumulierte (Pfeil). Nomarski-Aufnahme (A) und Immunfluoreszenz-Aufnahme (A').

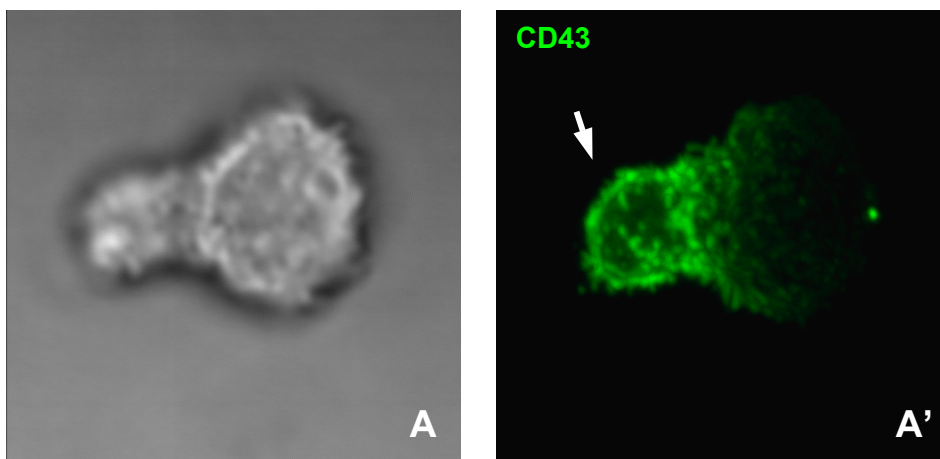


Abb. 4.26: **Verteilung von CD43 bei Migration einer aktivierten T-Zelle.** Naive T-Zellen wurden drei Tage mit  $\alpha$ -CD3-Antikörper aktiviert und anschließend auf Fibronektin gebracht. Nach 30 min wurden die Zellen fixiert und entsprechend Abb. 4.8 gefärbt. CD43 polarisierte deutlich am Uropod der migrierenden Zelle (Pfeil). Nomarski-Aufnahme (A) und Immunfluoreszenz-Aufnahme (A').

Um potenzielle Effekte einer Bindung und damit Stimulation durch CD43-Antikörper abschätzen zu können, wurde ein Aktivierungsassay mit plattengebundenen CD43-Antikörpern (10  $\mu$ g/ml) durchgeführt. Als Positivkontrolle für die Aktivierung der naiven T-Zellen wurden die Zellen mit plattengebundenem CD3-Antikörper und zusätzlichem CD28-Antikörper im Überstand inkubiert. Nach 72 Stunden wurde die Expression der Aktivierungsmarker CD25, CD62L und CD69 auf den T-Zellen mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 4.27). Hierbei zeigte sich, dass eine Stimulierung mit CD43-Antikörpern für 72 Stunden einen Effekt auf die Regulation des Aktivierungsmarkers CD25 und CD69, nicht jedoch auf CD62L hatte. Trotz dieser Effekte auf die T-Zell-

Aktivierung nach 72 Stunden wurde CD43 aufgrund seiner einzigartigen Polarisation am Uropod für das Festkleben am Cantilever verwendet. Die T-Zellen wurden allerdings für die Versuche nicht länger als eine Stunde verwendet, um artifizielle Messergebnisse möglichst auszuschließen. Im Zeitraum der Messungen hatte der anti-CD43 Antikörper keinen messbaren Einfluss.

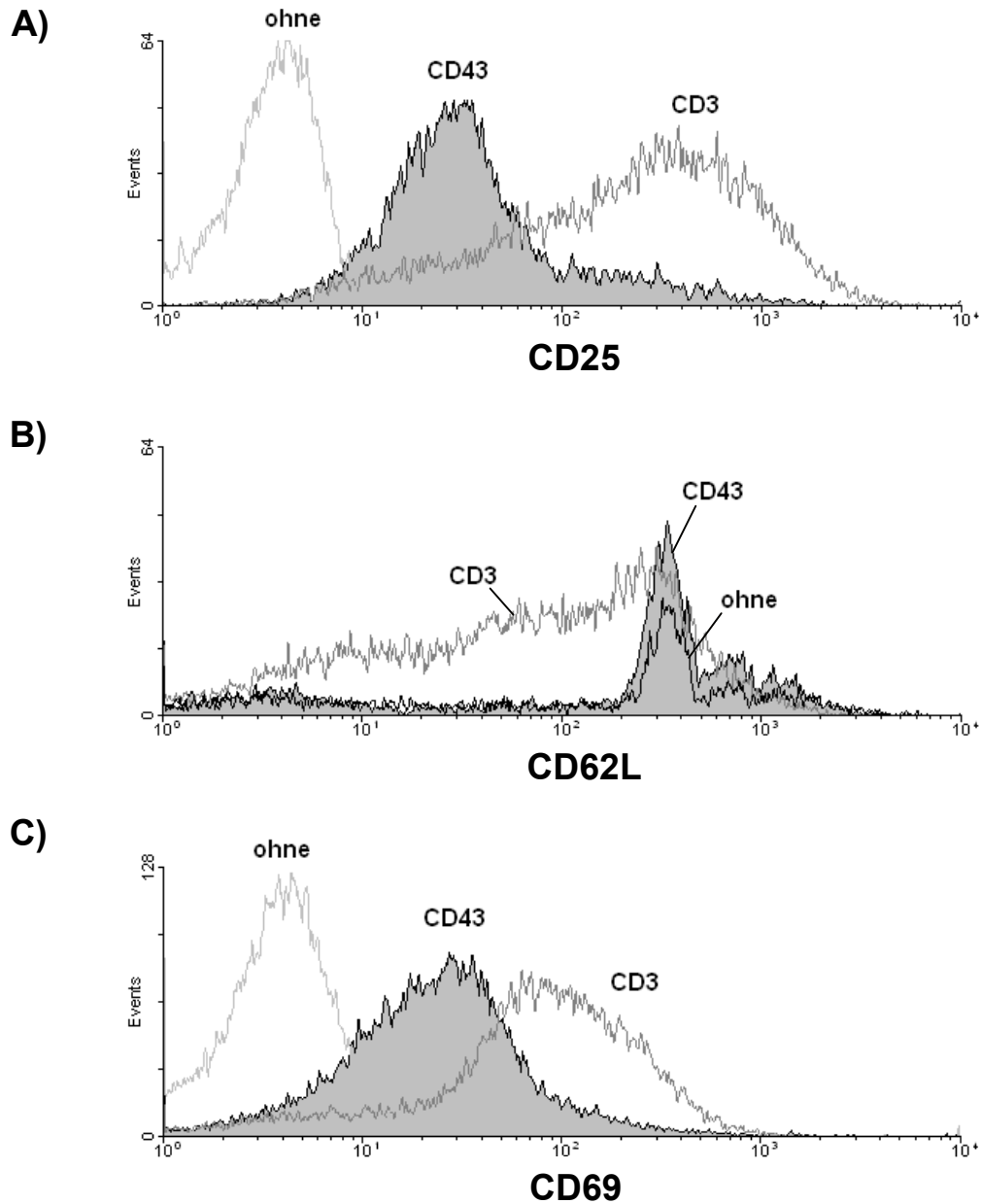


Abb. 4.27: **Effekte der Stimulierung von naiven T-Zellen mittels CD43-Antikörper.** Naive T-Zellen wurden 72 Stunden mit plattengebundenen Antikörpern inkubiert (10  $\mu$ g/ml). Als Positivkontrolle wurden CD3-Antikörper und CD28-Antikörper verwendet. Die Analyse erfolgte am Durchflusszytometer, die Auswertung mithilfe von Histogrammen. Gemessen wurde die Expression der klassischen Aktivierungsmarker CD25 (A), CD62L (B) und CD69 (C). Während CD25 und CD69 bei Aktivierung aufreguliert wurden, wurde CD62L herunterreguliert.

Nachdem eine T-Zelle an einen mit anti-CD43-Antikörpern beschichteten Cantilever gekoppelt wurde, konnten Messungen mit naiven B-Zellen oder reifen DCs durchgeführt werden (siehe 3.16). Bei den Interaktionen mit naiven B-Zellen zeigte sich, dass diese Interaktionen in den Kraftabstandskurven scheinbar nur sehr schwache Bindungskräfte aufwiesen, während die DCs sehr adhäsiv waren und sehr starke Wechselwirkungen mit den T-Zellen eingingen. Exemplarisch sind in Abb. 4.28 zwei Abstandskurven von Interaktionen mit naiven B-Zellen oder DCs aufgezeigt.

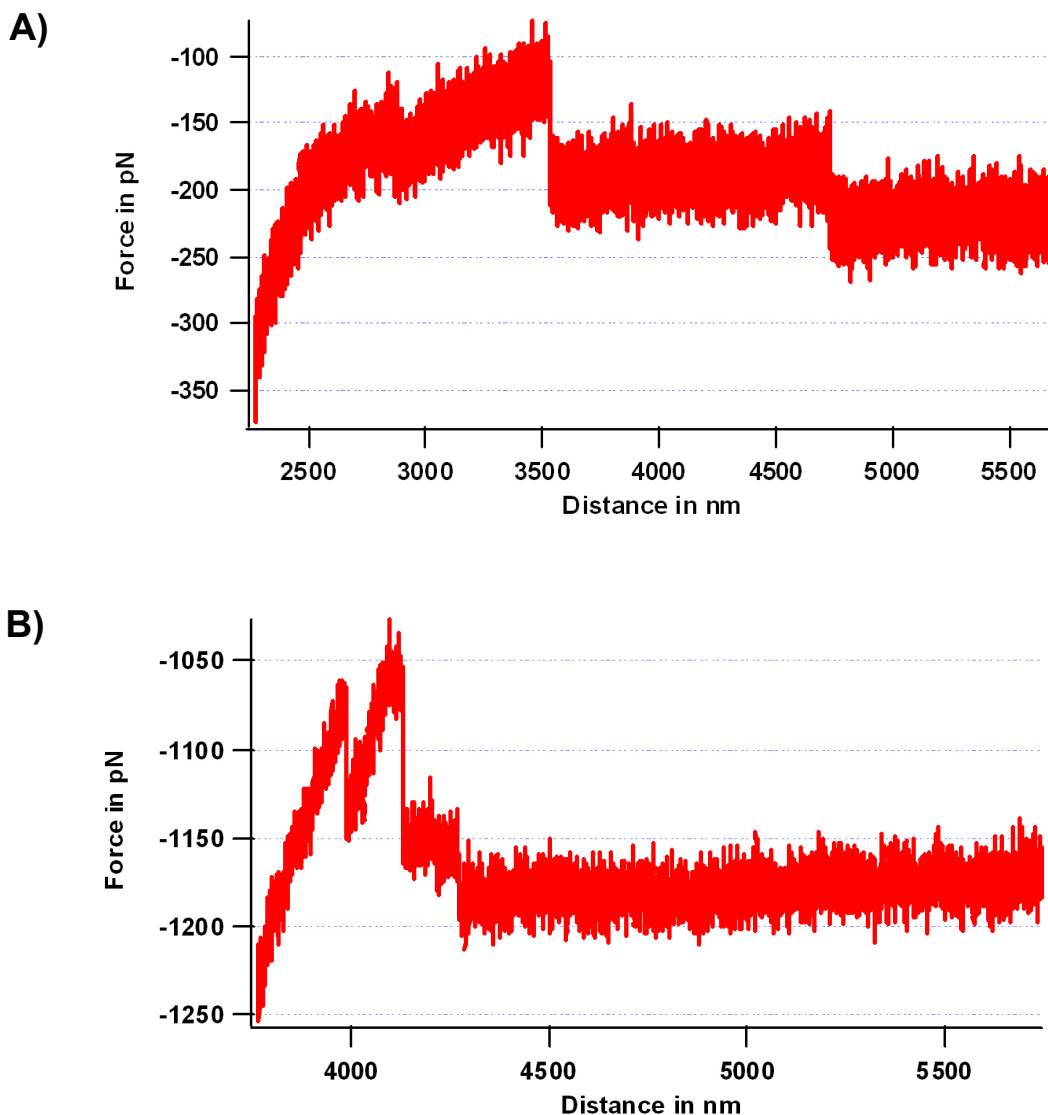


Abb. 4.28: **Kraftabstandskurven von Messungen von Interaktionen zwischen T-Zellen mit APCs.** Die Messungen wurden durchgeführt mit einer Kraft von 100 pN für 5 sec, d.h. die Zellen wurden für 5 sec mit einer Kraft von 100 pN zusammengedrückt, anschließend wieder getrennt und die Kräfte bei der Trennung gemessen. Kraftabstandskurve für Messung von T-Zelle mit naiver B-Zellen (A) und DC (B). Die y-Achse ist relativ skaliert.

In den Kraftabstandskurven erschienen die Messungen mit DCs (Abb. 4.28, B) gegenüber den Messungen mit naiven B-Zellen (Abb. 4.28, A) sehr stark, jedoch wurden für die Auswertung nur der letzte Abriss in der Kraftabstandskurve für die Auswertung verwendet und in einem Verteilungsgraphen aufgetragen, da dieser die eigentliche Trennung von T-Zelle und APC darstellte. Dies relativierte die Beobachtungen. Es zeigte sich bei den Messungen, dass naive B-Zellen mit T-Zellen mit einer durchschnittlichen Kraft von 20,43 pN bei 100 pN Kontaktkraft und einer Kontaktdauer von 5 sec miteinander interagierten (Abb. 4.29), während bei Kontakten von DCs mit T-Zellen ein Kraftaufwand von durchschnittlich 22,56 pN notwendig war, um die Zellen voneinander zu trennen (Abb. 4.30).

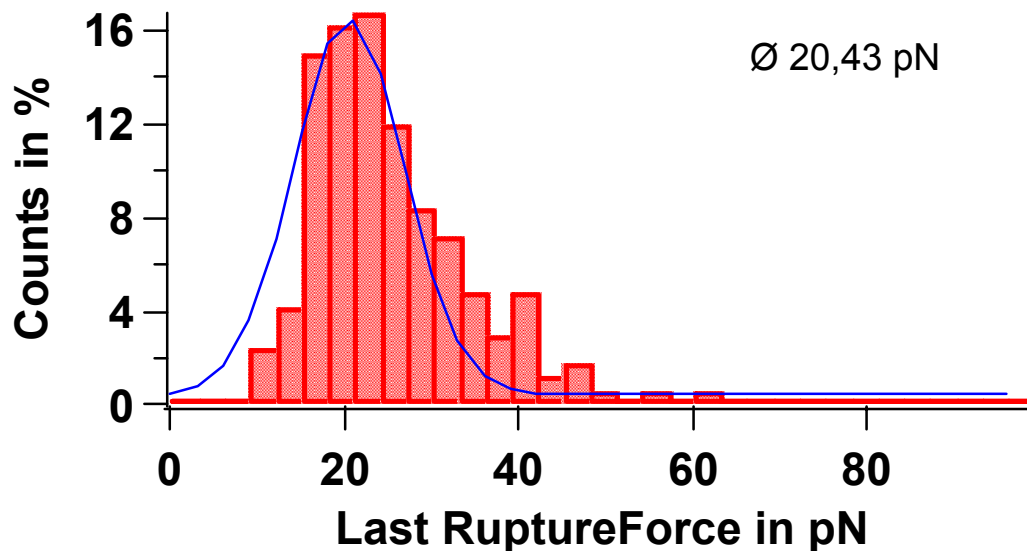


Abb. 4.29: **Verteilungsgraph von Bindungskräften zwischen T-Zellen und B-Zellen.** Naive T- und B-Zellen wurden isoliert, die B-Zellen entsprechend mit 100 µg/ml OVAp beladen und auf einer Petrischale mit Poly-L-Lysin festgeklebt. T-Zellen wurden mittels eines CD43-beschichteten (10 µg/ml) Cantilevers aufgenommen. Anschließend wurden Kontakte zwischen T- und B-Zellen ausgelöst, getrennt und die Bindungskräfte zwischen den Zellen gemessen. Dabei wurden die Zellen mit einer Kraft von 100 pN für 5 sec zusammengebracht. Die Daten entsprechen exemplarisch einer Versuchsreihe, in der > 3 Ansätze (T-Zellen) nacheinander > 50 Mal in Kontakt mit B-Zellen gebracht wurden. Die durchschnittliche Bindungskraft betrug 20,43 pN.

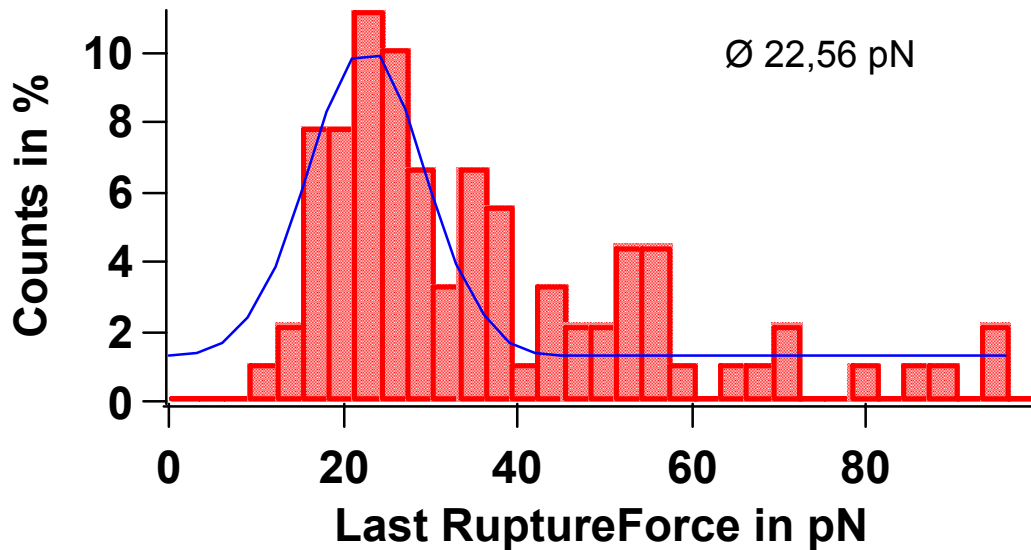


Abb. 4.30: **Verteilungsgraph von Bindungskräften zwischen T-Zellen und DCs.** DCs wurden von dem Labor Michael Sixt am MPI in München gestellt, mit 1 µg/ml OVAp beladen und auf eine Petrischale mit Poly-L-Lysin festgeklebt. Die Versuchsdurchführung erfolgte entsprechend Abb. 4.29. Die Daten entsprechen exemplarisch einer Versuchsreihe, in der > 3 Ansätze (T-Zellen) nacheinander > 50 Mal in Kontakt mit DCs gebracht wurden. Die durchschnittliche Bindungskraft betrug 22,56 pN.

Leider erbrachten die Kontroll-Messungen von Zellinteraktionen mit unbeladenen APCs ähnliche Messwerte wie diejenigen Kontakte mit OVAp-beladenen APCs. Bei Kontakten mit unbeladenen naiven B-Zellen wurden Kräfte von 21,39 pN gemessen, während die Kontakte mit unbeladenen DCs mit 15,19 pN geringfügig schwächer ausfielen (Daten nicht gezeigt). Gleichzeitig konnte eine Blockierung der Interaktionen mit einem MHC-II-Antikörper ebenfalls nicht die Interaktionen zwischen den Zellen inhibieren, so dass hierbei ähnlich hohe Kräfte zwischen T-Zelle und APC gemessen wurden. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die gemessenen Interaktionen antigenspezifisch waren.

Die Messungen mit DCs gestalteten sich äußerst schwierig, da diese häufig durch lange Membranausstülpungen in Kontakt mit dem Cantilever kamen und somit die Messungen verfälschten. Interessanterweise konnte bei Interaktionen mit naiven B-Zellen eine wichtige Beobachtung gemacht werden. Über mehrere Messungen hinweg wurden wiederholt zwischen T-Zelle und B-Zelle nur schwache Wechselwirkungen gemessen, bis es unerwartet zu einer sehr starken Interaktion beider Zellen kam, die nicht zu trennen war und dazu führte, dass die B-Zelle von Plattenboden abgerissen wurde. Diese Interaktionen scheinen somit die eigentlichen antigenspezifischen Interaktionen gewesen zu sein, welche es zu messen galt.



## **5 Diskussion**

Die Aktivierung von T-Zellen ist ein sensibler und fein abgestimmter Prozess, der einer Vielzahl von Mechanismen unterliegt. Bei Erkennung des spezifischen Antigen-MHC-Komplexes auf der Oberfläche einer antigenpräsentierenden Zelle (APC) durch den T-Zellrezeptor (TCR) erfolgt die Ausbildung von adhäsiven Kontakten zwischen T-Zelle und APC. Diese Kontakte unterscheiden sich in Abhängigkeit der jeweiligen APC (naive oder aktivierte B-Zelle, Dendritische Zelle [DC]), der Expression und des Aktivierungsstatus' von zahlreichen Oberflächenmolekülen sowie der Initiation von intrazellulären Signaltransduktionskaskaden. Dies hat zur Folge, dass ein Pool aus denselben T-Zellen, wie er aus TCR-transgenen Mausstämmen isoliert werden kann, bei antigenspezifischen Kontakten mit verschiedenen APCs ein breites Spektrum von Interaktionstypen und Aktivierungsmechanismen aufweist.

In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich Interaktionen von naiven, TCR-transgenen DO11.10- oder OT-II-T-Zellen mit verschiedenen Balb/c- bzw. C57Bl/6-APCs (naive oder aktivierte B-Zellen, reife DCs) unterscheiden. Als Parameter wurden hierbei die Struktur der Immunologischen Synapse (IS), die Organization des Aktin- und Mikrotubuli-Zytoskeletts sowie der Effekt des CYTIP-Knockdowns in DCs untersucht. Schließlich wurde ein System entwickelt, mit dem es möglich ist, Adhäsionskräfte bei antigenspezifischen Kontakten mittels Kraftspektroskopie zu messen.

### **5.1 Die Immunologische Synapse und die Rolle der antigen-präsentierenden Zelle**

Die Entdeckung der IS bei antigenspezifischen Kontakten durch (Monks et al., 1998) war ein entscheidender Wendepunkt im Verständnis der Interaktion und Aktivierung von T-Zellen mit ihren APCs. Zwar war zuvor schon bekannt, dass eine Umverteilung von Proteinen, extra- wie intrazellulär, zu der Kontaktfläche während der Interaktion erfolgt (Kupfer and Singer, 1989; Kupfer et al., 1987; McCloskey and Poo, 1986), die Organization von Signal- und Adhäsionsmolekülen in distinkten Arealen innerhalb der Kontaktfläche erschien die Interaktionen und die folgenden Aktivierung der T-Zelle jedoch auch anschaulich zu erklären: Durch eine zentrale Akkumulation von Signalmolekülen wird die T-Zelle aktiviert, während Adhäsionsmoleküle den Kontakt beider Zellen vermitteln (Grakoui et al., 1999). Zweifel an dieser Theorie kamen allerdings auf, als gezeigt werden konnte, dass bereits vor Bildung der reifen IS die

wichtigsten Signalkaskaden innerhalb der T-Zellen aktiviert und wieder beendet werden (Lee et al., 2002). Schließlich wurde in den letzten Jahren ausführlich gezeigt, dass Microcluster, in denen TCR-MHCp-Komplexe mit Signalmolekülen co-lokalisiert sind, von der Peripherie der Kontaktfläche in den cSMAC der IS fließen und keine Signalgebung im Zentrum der IS stattfindet (Varma et al., 2006; Yokosuka et al., 2005). Somit stellt der cSMAC der Theorie nach eine Balance zwischen TCR-Signaling und Degradation von TCR-Molekülen dar und reguliert auf diese Weise die Signalstärke (Lee et al., 2003; Purdie et al., 2005). Interessanterweise wurde bei Interaktionen von T-Zellen mit DCs im Gegensatz zur T-Zell-B-Zell-Interaktion keine Bildung einer klassischen cSMAC-pSMAC-IS beschrieben, sondern vielmehr eine Anreicherung von Signal- und Adhäsionsmolekülen in lokalen Foci, so dass sich hier der Begriff der „multifokalen IS“ eingebürgert hat (Brossard et al., 2005).

Eine vergleichende Untersuchung zur Ausbildung einer IS mithilfe eines Pools von primären, naiven TCR-transgenen T-Zellen und primären APCs, wie in dieser Arbeit durchgeführt, wurde bisher nicht beschrieben. Vielmehr werden in der Literatur eine Vielzahl von Mauslinien, immortalisierten T- und B-Zellklonen und artifizielle APCs, wie transfizierte Fibroblasten oder Lipidbilayer, in denen fluoreszenzmarkierte Moleküle verankert sind, verwendet. Dies macht eine Einordnung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse schwierig.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass naive B-Zellen als einziger Zelltyp in antigenspezifischen Interaktionen mit naiven CD4<sup>+</sup>-T-Zellen die Bildung einer klassischen cSMAC-pSMAC-IS aufweisen (Abb. 4.1). Interaktionen derselben T-Zellen mit aktivierten B-Zellen und reifen DCs zeigten diese Strukturen weitaus weniger bzw. sehr selten (Abb. 4.2). Hierbei zeigte sich außerdem, dass die Formation der IS in T-naive B-Zellinteraktionen in Abhängigkeit der applizierten Antigenmenge erfolgt (Abb. 4.3). Interessanterweise führten sowohl eine geringe, als auch eine sehr hohe Antigenmenge bei professionellen APCs, wie es DCs sind, nicht zur Bildung einer IS. Schließlich konnte durch Messung der Expression von costimulatorischen Molekülen der B7-Familie (CD80 und CD86) auf der Oberfläche der verwendeten APCs deutlich gezeigt werden, dass derjenige Zelltyp in antigenspezifischen Kontakten eine klassische IS ausbildete, welcher über die geringste Menge an CD80- und CD86-Molekülen auf der Oberfläche verfügte, nämlich naive B-Zellen (Abb. 4.4). Bei Aktivierung der B-Zellen erfolgte schließlich eine stark erhöhte Expression von CD86, während diejenige von CD80 weiterhin auf dem Niveau der naiven B-Zellen verblieb.

Erst reife DCs wiesen eine starke Expression von sowohl CD80 als auch CD86-Molekülen auf ihrer Oberfläche auf.

Bezüglich der Formation der IS und Expression von B7-Molekülen ließe sich daraus die Hypothese aufstellen, dass eine naive B-Zelle eine IS mit einer naiven T-Zelle ausbildet, um die wenigen vorhandenen Signalmoleküle innerhalb der Kontaktfläche zu akkumulieren und somit die T-Zellen zu aktivieren. Innerhalb der IS kommt es dabei neben der TCR-Akkumulation im cSMAC zu einer Anreicherung von costimulatorischen CD80/CD86-Molekülen (Pentcheva-Hoang et al., 2004; Bromley et al., 2001). Interessanterweise aktivieren naive B-Zellen naive T-Zelle dahingehend, dass diesen einen regulatorischen Phänotyp erhalten (Reichardt et al., 2007). Diese B-Zell-induzierten regulatorischen T-Zellen sind in der Lage *in vitro* naive T-Zellen in einer kontaktabhängigen Art an der Aktivierung durch DCs und an der Proliferation zu hindern. Außerdem sind sie in der Lage *in vivo* bei Applikation die Abstoßungsreaktion einer ektopischen allogenen Herztransplantation zu verzögern (Reichardt et al., 2007). (Clatza et al., 2003) konnten zeigen, dass B-Zellen nach einiger Zeit der Interaktion mit T-Zellen und durch Stimulation des costimulatorischen Moleküls CD40 ihre Antigenpräsentation und die Expression des Moleküls CD80 erhöhen. CTLA-4, neben CD28 der Ligand für B7-Moleküle und ein wichtiger Negativregulator für T-Zellen, wird von CD80 bevorzugt gebunden (Pentcheva-Hoang et al., 2004), wodurch ein Mechanismus zur Aktivierung der T-Zellen mit einem regulatorischen Phänotyp ausgelöst werden könnte.

Bei fortschreitender Aktivierung regulierten naive B-Zellen das B7.2-Molekül (CD86) stark herauf (Abb. 4.4). Der bevorzugte Ligand von CD86 ist CD28, welches gegenüber CTLA-4 eine antagonistische Rolle einnimmt und T-Zellen aktiviert (Pentcheva-Hoang et al., 2004). Dies zeigt sich ebenfalls in der Fähigkeit aktivierter B-Zellen naive T-Zellen zu aktivieren. In Proliferationsassays bringen aktivierte B-Zellen naive T-Zellen nahezu genauso stark zum proliferieren wie reife DCs (Gunzer et al., 2004).

DCs werden als professionelle APCs bezeichnet. Sie sind in der Lage mit geringen Antigenmengen naive T-Zellen sehr stark zu aktivieren (Gunzer et al., 2004; Delon et al., 1998). Die Expression von costimulatorischen Molekülen erreichte hier den höchsten Wert bei den untersuchten APCs. Die Interaktionen mit naiven T-Zellen sind im Gegensatz zu den stabilen, lang anhaltenden Kontakten zu naiven B-Zellen, hier sehr dynamisch (Gunzer et al., 2000; Gunzer et al., 2004) und die T-Zelle migriert über die Oberfläche der DC. Zusätzlich sind DCs der einzige Zelltyp der keine klassische cSMAC-pSMAC-IS mit naiven T-Zellen ausbildete (Abb. 4.2). Wie bereits erwähnt, wird die Struktur der IS als „multifokal“ bezeichnet (Brossard et al., 2005) mit

Anreicherungen von TCR- und LFA-1-Molekülen in kleinen „Mini-Synapsen“. Diese Strukturen könnten vergleichbar sein mit den Microclustern, welche von der Peripherie der IS in den sich bildenden cSMAC fließen und eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen (Varma et al., 2006; Yokosuka et al., 2005). Allerdings muss man hierbei berücksichtigen, dass diese Untersuchungen anhand von artifiziellen APCs (Lipid-Bilayern) erfolgte. Dennoch wird seit kurzem ein ähnliches Modell für die IS-Formation bei migrierenden T-Zellen verwendet. Demnach kommt es bei der Migration der T-Zelle auf einer DC zu der Bildung einer „dynamischen IS“, welche seit kurzem in der aktuellen Literatur als „Kinapse“ bezeichnet wird (Dustin, 2007). Hierbei nimmt der vordere Bereich des Lamellipodiums den Bereich des dSMACs ein, dem die Lamella folgt, welche Moleküle des pSMACs beinhaltet. Dem folgt der Bereich des cSMACs, während bestimmte Moleküle, welche bei migrierenden Zellen am Uropod akkumulieren, dies hier ebenfalls tun.

Die Bildung einer klassischen cSMAC-pSMAC-IS unterliegt zusammengefasst verschiedenen Parametern. Zum Einen scheint die Stabilität der Kontakte für die Ausprägung ein wichtiges Kriterium zu sein. Während naive B-Zellen mit ihren stabilen Kontakten eine IS ausbilden, erfolgt bei den dynamischen T-DC-Interaktionen die Bildung einer dynamischen IS („Kinapse“). Die Expression von costimulatorischen Molekülen der B7-Familie scheint hierbei zusätzlich den Phänotyp der aktivierten T-Zelle (B-Zell-induzierte regulatorische T-Zelle gegenüber voll aktivierte T-Effektorzelle) zu beeinflussen.

## **5.2 Das Zytoskelett in T-Zellen und antigenpräsentierenden Zellen**

Das Mikrotubuli- und Aktin-Zytoskelett spielt bei Interaktionen mit APCs und der Aktivierung von naiven T-Zellen eine entscheidende Rolle: Transport von Vesikeln, gerichtete Sekretion, Stabilität oder Veränderung der Zellmorphologie und Migrationsprozesse sind eng mit der Stimulation durch den TCR verbunden. Jedoch weist derselbe Typ naiver T-Zellen in Interaktionen mit verschiedenen APCs einen unterschiedlichen Phänotyp auf, sowie sich ebenfalls die Polarisation und Verteilung von zytoskelettalen Proteinen bei den drei untersuchten Interaktionstypen insgesamt unterscheidet. In dieser Arbeit wurde untersucht, wie sich das Mikrotubuli-Zytoskelett während der Interaktion von naiven T-Zellen mit naiven und aktivierten B-Zellen und DCs polarisiert. Gleichzeitig wurde untersucht, wie das Aktin-Zytoskelettprotein ARP2/3

während der Interaktionen polarisiert und ob sich daraus Rückschlüsse auf den Phänotyp der Interaktion ziehen lassen.

Die Lage des Mikrotubuli-organisierenden Zentrum (MTOC) ist ein wichtiges Kriterium, um die Polarisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts zu beurteilen. Bei migrierenden T-Zellen liegt das MTOC hinter dem Zellkern in der Nähe des Uropods (Abb. 4.7; (Friedl and Brouck, 2000; Ratner et al., 1997)). Gleichzeitig erreichen diese Zellen Migrationsgeschwindigkeiten von 7–10  $\mu\text{m}/\text{min}$  und sind damit ungefähr 10 mal schneller als migrierende Fibroblasten (0,3–1,3  $\mu\text{m}/\text{min}$ ; (Gudima et al., 1988)).

Während der Interaktion mit naiven und aktivierten B-Zellen sowie mit DCs polarisierte das MTOC der naiven T-Zellen zur Kontaktfläche (Abb. 4.8 bis 4.10). Zusätzlich erfolgte bei der Interaktion mit naiven B-Zellen eine charakteristische Elongation der naiven T-Zelle (Abb. 4.8), während bei der Interaktion mit anderen APCs (Abb. 4.9 und Abb. 4.10) eine solche Elongation nicht beobachtet wurde. Die Interaktion mit naiven B-Zellen wies außerdem die Besonderheit auf, dass die naive T-Zelle die B-Zelle aktiv vor sich herschob (Gunzer et al., 2004), während aktivierte B-Zellen T-Zellen zogen und die Kontakte mit DCs einer Migration der T-Zelle auf Oberfläche der DC entsprechen und kurz, dynamisch und sequenziell waren (Gunzer et al., 2000; Gunzer et al., 2004). Aufgrund der aktiven Bewegung der T-Zelle in Kontakt mit der naiven B-Zelle, bietet sich ein Vergleich mit der Migration von T-Zellen an (beide weisen im Übrigen eine ähnliche Verteilung von Uropodmarkern, wie z.B. CD43, auf (Abb. 4.25 und 4.26)). Dennoch müssen hier deutlich die Unterschiede in der Lage des MTOCs hervorgehoben werden. Neben dem MTOC werden in interagierenden naiven T-Zellen zusätzlich der Golgi-Apparat und Mitochondrien zur IS polarisiert (Quintana et al., 2007; Kupfer and Denner, 1984). In jedem Fall werden die Interleukine IL-2, IL-4 und IL-5 von T-Helferzellen zur Kontaktfläche über das Mikrotubuli-Zytoskelett transportiert, so dass die T-Zelle ihren gesamten Sekretionsapparat zur APC hin ausrichtet (Kupfer et al., 1991; Reichert et al., 2001).

Auf Seiten der APC kam es nur bei naiven und aktivierten B-Zellen zu einer Polarisation des MTOCs zur naiven T-Zelle (Abb. 4.8 und 4.9). Vor allem bei der Antigenpräsentation spielt das Mikrotubuli-Zytoskelett eine wichtige Rolle. Dennoch ist bisher in der Literatur nur wenig über die Mechanismen bekannt, welche die Reorganisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts und die Antigenpräsentation bei B-Zellen betreffen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Tyrosinkinase Syk  $\alpha$ -Tubulin nach Stimulation des BCR phosphoryliert, wenn auch die biochemische Funktion von

phosphoryliertem  $\alpha$ -Tubulin bei der Antigenpräsentation bisher unbekannt ist (Peters et al., 1996). Vesikel, welche MHC-II-Peptid-Komplexe enthalten, wandern bidirektional auf Mikrotubuli in B-Zellen und aktivierte Syk-defiziente B-Zellen haben eine gestörte Antigenaufnahme und –prozessierung und zeigen außerdem ein hochgradig unorganisiertes Mikrotubuli-Zytoskelett (Le et al., 2007).

Eine Polarisation des MTOCs zur Kontaktfläche scheint den gerichteten Transport von MHC-II-Peptid-enthaltenden Vesikeln zu begleiten. Wie die naiven T-Zellen richten somit auch naive und aktivierte B-Zellen ihren Sekretionsapparat zur IS hin aus.

DCs hingegen polarisierten ihr MTOC nicht zur Kontaktfläche mit naiven T-Zellen (Abb. 4.10). In den letzten Jahren konnte vielmehr gezeigt werden, dass DCs Tubulinfilamente ausbilden, welche vesikuläre MHC-II-Peptid-Komplexe zur Kontaktfläche transportieren (Boes et al., 2002; Vyas et al., 2007). Die Ausbildung dieser Tubulinfilamente wird hierbei durch die interagierende T-Zelle reguliert. Akkumulation von LFA-1 und CD2 an der Kontaktfläche initiiert bspw. die Ausbildung und den Transport dieser endosomalen MHC-II-Peptid-Komplexe (Bertho et al., 2003; Boes et al., 2003).

Zusammengefasst kann man also sagen, dass bei naiven T-Zellen die Polarisation des MTOC eine Ausrichtung des Sekretionsapparates darstellt, während naive und aktivierte B-Zellen einen gerichteten Transport von MHC-II-Peptid-Komplexen durchführen. DCs hingegen scheinen für eine effiziente Aktivierung der T-Zelle nicht auf eine MTOC-Polarisation angewiesen zu sein. Hier erfolgt ein anderer Mechanismus der Antigenpräsentation. Über Tubulinfilamente werden Vesikel mit MHC-II-Peptid-Komplexen zur T-Zelle transportiert, die die Ausbildung dieser Filamente initiieren.

Neben dem Mikrotubuli-Zytoskelett spielt das Aktin-Zytoskelett ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der T-Zelle und der Antigenpräsentation durch die APC. Der ARP2/3-Komplex ist dabei ein wichtiger Regulator der Aktinpolymerisation und Aktindynamik. Zum Einen kann der Komplex als Startpunkt für das Wachstum eines Aktinfilamentes dienen, zum Anderen kann er sich an ein bestehendes Aktinfilament anlagern und zur Verzweigung durch Initiation eines Tochterfilaments führen. Aufgrund seiner Wichtigkeit ist der ARP2/3-Knockout in der Maus im frühen Stadium der Embryonalentwicklung letal (Vauti et al., 2007).

Außerdem spielt der ARP2/3-Komplex eine wichtige Rolle bei der TCR-vermittelten Signalgebung und Aktinpolymerisation. Bei TCR-Stimulation erfolgt eine Aktinpolymerisation, welche durch den WASP/ARP2/3-Komplex initiiert wird. Dabei wird bei Stimulation der CD3-Ketten des TCR die Tyrosinkinase ZAP-70 aktiviert, welche daraufhin LAT und SLP-76 aktiviert. Hierbei erfolgt schließlich über Bindung von VAV1

und des WASP/ARP2/3-Komplexes die Verknüpfung zwischen TCR-Signalgebung und Aktin-Zytoskelett. Zusätzlich wird der gesamte Signalkomplex über Ankerproteine wie Talin und Vinculin an der Plasmamembran fixiert (Nolz et al., 2006; Krawczyk et al., 2002; Goda et al., 2004; Katagiri et al., 2004; Woods et al., 2001; Finkelstein et al., 2005).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der ARP2/3-Komplex in Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen neben einer Anreicherung im Bereich der Kontaktfläche, außerdem eine Akkumulation am Uropod der elongierten T-Zelle aufweist (Abb. 4.12). Diese uropodspezifische Anreicherung wurde in Interaktionen mit aktivierten B-Zellen und DC nicht mehr gefunden, ebenso wie die charakteristische Elongation der naiven T-Zelle, welche in Interaktionen mit naiven B-Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 4.15).

Den Phänotyp der elongierten interagierenden T-Zelle, mit dem einer migrierenden T-Zelle zu vergleichen bietet sich bei der ähnlichen Morphologie an. Dennoch muss beachtet werden, dass bei migrierenden T-Zellen die Aktindynamik wesentlich im Bereich der Vorderkante („*leading edge*“) erfolgt und dementsprechend Proteine des Aktin-Zytoskeletts hier ebenfalls polarisieren, wie der ARP2/3-Komplex (Rottner et al., 1999). An der „*leading edge*“ der Zelle vermitteln WASP, Profilin, ARP2/3 und Cofilin Membranausstülpungen durch Aktinpolymerisation und –depolymerisation. Aktin-bindende Proteine, welche Adhäsionsmoleküle mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden, sind hierbei Talin, Vinculin und  $\alpha$ -Actinin. Ena/Vasp- und Profilin-vermittelte Aktinpolymerisation scheinen außerdem an der Verbindung von adhäsiven Kontakten mit den Membranausstülpungen beteiligt zu sein.

Am Uropod der migrierenden T-Zelle ist ARP2/3 hingegen nicht lokalisiert. Eine wichtige Funktion des Uropods ist die Vorwärtsbewegung des Zellkörpers durch Zusammenziehen bzw. Nachziehen des Zellendes. Die Generierung der dafür notwendigen Kraft erfolgt über Myosin II-Proteine, Motorproteine des Aktin-Zytoskeletts. Radixin, ein Membran/F-Aktin-Linker der ERM- (Ezrin-Radixin-Myosin-) Familie co-lokalisiert mit Myosin II am Uropod. Plektin bindet schließlich F-Aktin und das Typ 3-Intermediärfilament Vimentin. Am Ende des Uropods co-lokalisieren schließlich die ERM-Proteine Moesin und Ezrin und verbinden ebenfalls Adhäsionsmoleküle mit dem Aktin-Zytoskelett (Samstag et al., 2003).

Der Phänotyp der naiven T-Zelle, welche mit einer naiven B-Zelle interagiert scheint somit trotz der Ähnlichkeiten zu einer migrierenden T-Zelle (Morphologie, Geschwin-

digkeit), nicht mit dieser vergleichbar zu sein (Ein T- naive B-Zellpärchen wandert mit einer Geschwindigkeit von ungefähr 12  $\mu\text{m}/\text{min}$  (Gunzer et al., 2004) und weist damit die Geschwindigkeit einer migrierenden T-Zelle auf).

### **5.3 Die Rolle von CYTIP in DCs während der Interaktion mit naiven T-Zellen**

Adhäsion spielt in antigenspezifischen Interaktionen eine entscheidende Rolle. Den größten Stellenwert nehmen dabei Adhäsionsmoleküle aus der Integrinfamilie ein, dessen prominentesten Vertreter hierbei LFA-1 darstellt. Interessanterweise sind die Interaktionen von naiven T-Zellen mit naiven B-Zellen in hohem Maße von der Bindung von LFA-1 an seinen Liganden ICAM-1 abhängig. Inhibition von LFA-1 z.B. durch Antikörper oder chemische Substanzen führt hier zu einem Abbruch der Interaktionen. LFA-1 wurde zusätzlich in T-naive B-Zellinteraktionen als essenziell für die Bildung einer klassischen cSMAC-pSMAC-IS beschrieben (Graf et al., 2007). So führt der Knockout von CD18 (die  $\beta_2$ -Untereinheit von LFA-1) zur Bildung von unstrukturierten IS, fehlender cSMAC-Formation und einer schlechteren T-Zellaktivierung. Dagegen sind Interaktionen von T-Zellen mit DC vollkommen unabhängig von einer LFA-1-ICAM-1-Interaktion, so dass inhibierende Antikörper keinen inhibierenden Effekt auf die antigenspezifischen Kontakte besitzen (Gunzer et al., 2004).

Ein wichtiger Regulator für die Aktivität von LFA-1 ist die ARF GTPase Cytohesin-1, deren Funktion in DCs wiederum durch ihren Antagonisten CYTIP reguliert wird (Boehm et al., 2003; Geiger et al., 2000). Der Knockdown von CYTIP mittels siRNA in humanen DCs führt zu einer verstärkten Adhäsion von T-Zellen und zu einer schlechteren Aktivierung (Hofer et al., 2006).

In murinen DCs wurde ein CYTIP-Knockdown mittels siRNA durchgeführt. Interaktionen mit naiven T-Zellen wiesen eine signifikant erhöhte Bildung einer cSMAC-Akkumulation innerhalb der Kontaktfläche auf (Abb. 4.19 und Abb. 4.20). Dennoch zeigten die T-Zellen, welche durch CYTIP-siRNA-DCs aktiviert wurden, keine Unterschiede in der Expression von verschiedenen Aktivierungsmarkern auf (CD25, CD62L und CD69; Abb. 4.21 und Abb. 4.22). Die aktivierten T-Zellen zeigten außerdem eine normale Effektorfunktion bei der Aktivierung naiver T-Zellen (Abb. 4.23). Schließlich zeigten die CYTIP-siRNA-DCs keine Nachteile der T-Zellaktivierung in Konkurrenz mit Wildtyp- bzw. Kontroll-siRNA-DCs (Abb. 4.24).



Wie bereits erwähnt, bilden naive T-Zellen in Kontakten mit naiven B-Zellen eine klassische cSMAC-pSMAC-IS aus (Abb. 4.1). Gleichzeitig sind diese Kontakte LFA-1-abhängig und zeichnen sich durch eine hohe Langlebigkeit und Stabilität aus (Gunzer et al., 2004). Durch den Knockdown von CYTIP in DCs kann Cytohesin-1 LFA-1 aktivieren, wodurch die Interaktionen langlebiger werden. Aufgrund einer LFA-1-vermittelten Interaktion mit DCs kommt es nun zur Akkumulation von TCR im cSMAC der IS. Wie bereits für T-naive B-Zellinteraktionen beschrieben, ist LFA-1 ein wichtiger Faktor für die Bildung eines cSMACs (Graf et al., 2007) und daher kann angenommen werden, dass derselbe Mechanismus bei Kontakten von T-Zellen mit CYTIP-siRNA-DCs ebenfalls zur Bildung eines cSMACs führt.

Die Wichtigkeit der Regulation der LFA-1-Aktivität konnten (Semmrich et al., 2005) durch Generierung einer Mauslinie zeigen, deren LFA-1-Moleküle konstitutiv aktiv sind (LFA-1<sup>d/d</sup>). Die Lymphozyten dieser Mäuse besitzen zahlreiche Defekte, wie Ablösungs- und Migrationsdefekte, gestörte Aktivierung von T-Zellen durch APCs.

Dennoch zeigten durch CYTIP-siRNA-DCs aktivierte T-Zellen keine Veränderung in ihrer Aktivierung (Abb. 4.21 und Abb. 4.22) und Effektorfunktion (Abb. 4.23). Dies könnte an einer möglichen Kompensation des CYTIP-Knockdown-Effekts liegen. (Watford et al., 2006) konnten durch Generierung einer CYTIP-Knockout-Maus zeigen, dass das Fehlen von CYTIP keinen negativen Effekt auf die T- oder B-Zellentwicklung oder -funktion besitzt. Adoptiver Transfer von DCs zeigte zudem keine gestörte Migration *in vivo*. Zusätzlich wurden T-Zellen durch CYTIP-defiziente DCs normal aktiviert (entsprechend der durchgeführten T-Zellaktivierung *in vitro*, Abb. 4.24). Lediglich bei der kompetitiven Repopulation von Stammzellen (Transfer von CYTIP-Knockout-Stammzellen und Wildtyp-Stammzellen) zeigten CYTIP-knockout-Stammzellen eine verringerte Fähigkeit zur Repopulation. Übertragen auf die durchgeführten Versuche kann somit angenommen werden, dass Rolle von CYTIP im murinen Immunsystem, im besonderen bezogen auf die Rolle in DCs, eher gering einzuschätzen ist oder kompensiert werden kann.

Die von (Hofer et al., 2006) durchgeführten Experimente im Humansystem ließen sich somit nicht auf das Mausmodell übertragen. Dies kann zum Einen daran liegen, dass die Versuche im Mausmodell antigenspezifisch waren, während die Versuche im Humansystem polyklonal waren. Dass Ergebnisse jedoch nicht vom Mausmodell auf das Humansystem übertragbar sind, kann trotz der Ähnlichkeiten im Immunsystem zwischen Maus und Mensch, auch an vielen spezifischen Eigenschaften liegen, in denen sich beide System voneinander unterscheiden. Einige wenige Beispiele, in

denen sich Zellen des Immunsystems von Maus und Mensch voneinander unterscheiden, seien hier erwähnt:

- CD4 wird auf humanen Makrophagen exprimiert, während es auf murinen Makrophagen nicht vorhanden ist (Crocker et al., 1987)
- die Rezeptoraffinität für das Chemotaxin fMLP (formyl-Met-Leu-Phe) ist in Mäusen gering, während sie in Menschen hoch ist (Gao and Murphy, 1993)
- IL-13 induziert in human B-Zellen einen Klassenwechsel der Antikörperproduktion zu IgE, nicht jedoch in murinen B-Zellen (Punnonen et al., 1993)
- IFN- $\alpha$  fördert die Differenzierung von T<sub>H</sub>1-Zellen im Menschen, nicht aber in Mäusen (Farrar et al., 2000)
- MHC-II-Moleküle werden auf humanen T-Zellen exprimiert, nicht jedoch auf murinen (Barnaba et al., 1994; Taams et al., 1999)
- der Chemokinrezeptor CXCR1 wird ebenfalls nur im humanen Immunsystem exprimiert (Olson and Ley, 2002; Zlotnik and Yoshie, 2000).

Ein aktuelles prominentes Beispiel für Experimente, welche im Mausmodell zu vollkommen anderen Ergebnissen als im Humansystem geführt haben, zeigt die klinische Anwendung des agonistischen monoklonalen Antikörpers TGN1412, der gegen das CD28-Antigen auf T-Zellen gerichtet ist und zur Behandlung von Multipler Sklerose, Blutkrebs und Rheuma vorgesehen war. Während die Applikation bei Mäusen, Ratten und Makaken die gewünschten Effekte brachte, führte bei einer klinischen Phase-I-Studie am Menschen im März 2006 bereits bei Applikation der subklinischen Dosis, 1/500 der vorher im Tierversuch als gefahrlos ermittelten Menge, zu schwerwiegenden Nebenwirkungen. In den betroffenen Probanden kam es infolge der Antikörpergabe zu einem Zytokinsturm, welcher ein „systemisches inflammatorisches Response-Syndrom“ aufgelöst hat (Suntharalingam et al., 2006).

Aufgrund ihrer sehr starken aktivierenden Eigenschaft reichen nur wenige DCs aus, um sehr viele naive T-Zellen zu aktivieren. Daraus ergibt sich die Schlussfolgerung, dass bereits wenige DCs, in denen der CYTIP-Knockdown nicht effizient erfolgt ist und die sich damit „normal“ verhalten, bereits einen starken Einfluss auf Aktivierungsversuche haben können. Es lässt sich somit nicht ausschließen, dass eine residuale Menge von CYTIP in DCs exprimiert wurde. Die Verwendung von siRNA-Oligos, welche bei erfolgreicher Transfektion die Zelle aufgrund einer GFP-Sequenz grün leuchten lassen, könnte hier sinnvoll sein. Positiv transfizierte Zellen könnten somit über einen

fluoreszenzaktivierten Zellsorter isoliert werden, so dass man eine Population von Zellen erhält, in welchen der CYTIP-Knockdown funktioniert.

Zusammengefasst kann man also sagen, dass CYTIP-siRNA in murinen DCs einen anderen Effekt als in human DCs hat. Während die Bildung eines cSMACs erhöht ist und T-Zellen stärker an den DCs adhären, kommt es dennoch zu einer vollständigen und normalen Aktivierung der T-Zellen. Der Effekt des CYTIP-Knockdowns scheint somit kompensierbar zu sein und die Eigenschaft der DCs als professionelle APC und starker T-Zellaktivator nicht eingeschränkt zu sein.

### 5.4 Kraftspektroskopie von antigenspezifischen Interaktionen

Die Interaktionen von naiven T-Zellen mit B-Zellen und DCs weisen eine Vielzahl von Unterschieden auf. Eine Vielzahl von Veröffentlichungen beschäftigen sich mit den molekularen Mechanismen der IS-Bildung, der Dynamik der Interaktion und das *in vivo*-Verhalten dieser Kontakte. Dennoch ist bis heute nicht bekannt, welche Kräfte zwischen den T-Zellen und den verschiedenen APCs wirken. Zur Messung von Zellinteraktionskräften kann hierzu ein Rasterkraftmikroskop (*atomic force microscope*, AFM) verwendet werden. Diese Technik wurde in der Vergangenheit vor allem für die Messung von einzelnen Molekülinteraktionen verwendet, wie bspw. die Interaktion von LFA-1 mit seinem Liganden ICAM-1 (Wojcikiewicz et al., 2006). Aber auch im Zellmaßstab wurden Systeme entwickelt, mit denen Interaktionskräfte zwischen Zellen gemessen werden konnten, wie die Bindungskräfte, welche zwischen Zellen des Eukaryoten *Dictyostelium discoideum* wirken (Benoit et al., 2000). Messungen von T-Zellen in antigenspezifischen Kontakten mit DC oder B-Zellen wurden in der Literatur bisher nicht beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines Systems zur Messung der Interaktionskräfte von antigenspezifischen Interaktionen mithilfe der AFM-Technik. Dafür wurde CD43 aufgrund seiner Akkumulation am Uropod der interagierenden T-Zellen als ein geeigneter Antikörper zur Befestigung der T-Zelle an eine Blattfeder (Cantilever) identifiziert. Da dieser Antikörper jedoch auf die T-Zellen stimulierend wirkt, wurden die T-Zellen nach ungefähr einer Stunde vom Cantilever entfernt und neue T-Zellen am Cantilever befestigt. Auf die in der Literatur verwendete Substanz ConA (z.B. (Wojcikiewicz et al., 2006)) zur Befestigung der T-Zellen wurde verzichtet, da diese

einen sehr starken Stimulator für T-Zellen darstellt. Nachdem die APC mit Poly-L-Lysin an den Plattenboden der Petrischale befestigt wurden, wurden Adhäsionskräfte gemessen, welche sich jedoch als artifiziell herausstellten (Abb. 4.28-30). Sowohl bei Beladung mit dem spezifischen Peptid als auch unbeladen wurden die gleichen Kräfte gemessen. Zusätzlich zeigte eine Inhibition mit einem MHC-II-Antikörper keinen Effekt auf die gemessenen Interaktionskräfte.

Interessanterweise wurde bei den Messungen von T-Zellen mit naiven B-Zellen einige Male die Beobachtung gemacht, dass nach mehreren schwachen Kontakten plötzlich eine sehr starke Interaktion der beiden Zellen erfolgte, welche schließlich die B-Zelle vom Plattenboden abriss. Erst dies scheinen antigenspezifische Interaktionen gewesen zu sein, während im Vorfeld anscheinend nur unspezifische Wechselwirkungen der Glykokalyx und anderer Oberflächenstrukturen gemessen wurden. Bei DCs wurde diese Beobachtung nicht gemacht. Allerdings gestalteten sich Messungen von T-Zellen im Kontakt mit DCs zusätzlich als schwierig, da die sehr motilen DCs mit Lamellipodien und Filopodien häufig am Cantilever adhärten und somit eine genaue Messung immer wieder unmöglich machten.

Zusammengefasst kann also gesagt werden, dass die vorhandene Methode zur Messung von Kräften bei Interaktionen von T-Zellen mit verschiedenen APCs nicht ausreichend war und dass es möglich ist, Interaktionen von einer T-Zelle mit einer naiven B-Zelle durch wiederholte Kontaktaufnahme zu generieren. Diese Kontakte sind dann allerdings so stark, dass die Adhäsion der B-Zelle am Plattenboden mit Poly-L-Lysin nicht ausreichend stark ist, um beide Zellen wieder voneinander zu trennen und somit die Kräfte der Interaktionen zu messen. Die Befestigung der APC am Plattenboden, z.B. mit Unterdruck, könnte hier helfen, richtige Interaktionskräfte von T-Zellen mit naiven B-Zellen messen zu können. Ein ähnliches Verfahren, bei dem eine Zelle mit Unterdruck fixiert wird, um AFM-Messungen durchzuführen, wurde erst kürzlich durch (Pamir et al., 2007) beschrieben. Die Verwendung dieser Methode sollte auch bei der Messung von antigenspezifischen Kontakten zu verwendbaren Ergebnissen führen können.

## **5.5 Ausblick**

Die Interaktionen von T-Zellen mit APCs unterschieden sich in einer Vielzahl von verschiedenen Parametern. Die Verteilung von Proteinen innerhalb der IS sowie der Phänotyp der beteiligten Zellen sind dabei nur die deskriptiv erfassbaren Unterschiede. Der Knockdown von Zytoskelettproteinen, Regulatoren oder Signalmolekülen mittels siRNA eröffnet die Möglichkeit, biochemisch die Unterschiede in den Interaktionen tiefer zu untersuchen. Neben CYTIP könnten die Effekte eines Knockdowns von GTPasen wie VAV1, welche ebenfalls an der LFA-1-Aktivierung beteiligt sind, wertvolle Informationen in der vergleichenden Analyse liefern. Mithilfe von Microarrays könnten zusätzlich Daten erhalten werden, inwiefern T-Zellen durch verschiedene APCs aktiviert werden. Schließlich könnte mithilfe von Pulldown-Assays die Aktivierung verschiedener GTPasen in den verschiedenen Interaktionstypen erfasst werden.

Mit dem Aufbau eines Systems zur Messung von antigenspezifischen Zellinteraktionen wurden die Anfänge gesetzt, um ebenfalls die unterschiedlichen Kräfte messen zu können, welche bei der Interaktion mit APCs auftreten. Die Verwendung einer Unterdruckpumpe für die Befestigung der Zellen, um keine artifiziellen Messergebnisse zu erhalten, dürfte sich hierbei als sinnvoll erweisen.

## 6 Summary

T cells need physical contact to an antigen presenting cell (APC) for their antigen specific activation. Depending on the APC, dendritic cell (DC) or B cell, T cells are activated differentially and the interactions between T cell and APC appear highly variable. While contacts with naive B cells are very stable, but simultaneously dynamic, contacts with DCs are often short and sequential events. Nevertheless, T cells are activated by DCs much stronger than by naive B cells (measured by T cell proliferation).

In this work, differences in the interactions of naive T cells with different APCs were investigated. Thereby, it was shown that contacts between naive T and B cells display the formation of a classical immunological synapse (IS), an accumulation of signaling and adhesion molecules, within the contact area. The formation of an IS was furthermore depending on the B cell antigen loading and was not found in interactions with activated B cells or DCs. Simultaneously, differences in the distribution of the actin cytoskeleton protein complex ARP2/3 and the polarisation of the microtubule cytoskeleton (measured by reorientation of the microtubule organizing centre, MTOC) were shown. T cells displayed an ARP2/3 bipolarisation in interactions with naive B cells both at the contact area and at the uropod of the elongated T cell. Neither the T cell elongation nor the ARP2/3 bipolarisation could be detected in interactions with activated B cells or DCs. Additionally, the T cell MTOC was reoriented towards the contact area in interactions with all three APCs as well as in naive and activated B cells, whereas only DCs did not show such a polarisation of the microtubule cytoskeleton.

Interactions of T cells with naive B cells are, in contrast to contacts with DCs, highly depending on the integrin  $\alpha_L\beta_2$  (LFA-1). LFA-1 is activated by multiple mechanisms, amongst others through binding of its  $\beta_2$ -subunit by cytohesin-1. CYTIP, the cytohesin-interacting protein, disturbs this cytohesin-depending LFA-1 activation by translocation of cytohesin-1 to the cytoplasm.

In this work, it was shown that protein knockdown of CYTIP with the siRNA technique in DCs leads to a slightly but significantly increased IS formation in interactions with naive

T cells. Simultaneously, the contact time was increased. However, no differences in the T cell priming capacity of CYTIP-siRNA DCs were measured.

Additionally, the expression of T cell activation markers, such as CD25, CD62L and CD69, after antigen specific activation by CYTIP-siRNA DCs were, in comparison with control DCs, not altered. Furthermore, full effector T cells were generated which were able to activate freshly isolated, naive T cell efficiently. Besides, CYTIP-siRNA DCs were capable to activate naive T cells when co-cultured with control-siRNA DCs with a mixture of loaded and unloaded DCs (control- as well as CYTIP-siRNA DCs). So CYTIP-siRNA did not lead to a measurable disadvantage in the priming capacity of DCs.

In summary these data show that the formation of an IS is controlled by the APC. At this, the LFA-1-mediated adhesion of the T cell-APC contact plays a pivotal role. Naive T cells thereby show a diverse distribution of signaling- and cytoskeletal proteins in contacts with different APCs. Finally, an enhancement of adhesion in T cell-DC interactions does not lead to a measureable change in T cell activation.

## 7 Referenzen

- Al-Alwan,M.M., Rowden,G., Lee,T.D., and West,K.A. (2001). The dendritic cell cytoskeleton is critical for the formation of the immunological synapse. *J. Immunol.* **166**, 1452-1456.
- Ardouin,L., Bracke,M., Mathiot,A., Pagakis,S.N., Norton,T., Hogg,N., and Tybulewicz,V.L. (2003). Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse. *Eur. J. Immunol.* **33**, 790-797.
- Barcia,C., Thomas,C.E., Curtin,J.F., King,G.D., Wawrowsky,K., Candolfi,M., Xiong,W.D., Liu,C., Kroeger,K., Boyer,O., Kupiec-Weglinski,J., Klatzmann,D., Castro,M.G., and Lowenstein,P.R. (2006). In vivo mature immunological synapses forming SMACs mediate clearance of virally infected astrocytes from the brain. *J. Exp. Med.* **203**, 2095-2107.
- Barnaba,V., Watts,C., de,B.M., Lane,P., and Lanzavecchia,A. (1994). Professional presentation of antigen by activated human T cells. *Eur. J. Immunol.* **24**, 71-75.
- Barnden,M.J., Allison,J., Heath,W.R., and Carbone,F.R. (1998). Defective TCR expression in transgenic mice constructed using cDNA-based alpha- and beta-chain genes under the control of heterologous regulatory elements. *Immunol. Cell Biol.* **76**, 34-40.
- Benoit,M., Gabriel,D., Gerisch,G., and Gaub,H.E. (2000). Discrete interactions in cell adhesion measured by single-molecule force spectroscopy. *Nat. Cell Biol.* **2**, 313-317.
- Benvenuti,F., Lagaudriere-Gesbert,C., Grandjean,I., Jancic,C., Hivroz,C., Trautmann,A., Lantz,O., and Amigorena,S. (2004). Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J. Immunol.* **172**, 292-301.
- Bertho,N., Cerny,J., Kim,Y.M., Fiebiger,E., Ploegh,H., and Boes,M. (2003). Requirements for T cell-polarized tubulation of class II+ compartments in dendritic cells. *J. Immunol.* **171**, 5689-5696.
- Billadeau,D.D., Nolz,J.C., and Gomez,T.S. (2007). Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 131-143.
- Binnig,G., Quate,C.F., and Gerber,C. (1986). Atomic force microscope. *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930-933.
- Boehm,T., Hofer,S., Winklehner,P., Kellersch,B., Geiger,C., Trockenbacher,A., Neyer,S., Fiegl,H., Ebner,S., Ivarsson,L., Schneider,R., Kremmer,E., Heufler,C., and Kolanus,W. (2003). Attenuation of cell adhesion in lymphocytes is regulated by CYTIP, a protein which mediates signal complex sequestration. *EMBO J.* **22**, 1014-1024.
- Boes,M., Bertho,N., Cerny,J., Op den,B.M., Kirchhausen,T., and Ploegh,H. (2003). T cells induce extended class II MHC compartments in dendritic cells in a Toll-like receptor-dependent manner. *J. Immunol.* **171**, 4081-4088.



- Boes, M., Cerny, J., Massol, R., Op den, B.M., Kirchhausen, T., Chen, J., and Ploegh, H.L. (2002). T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* 418, 983-988.
- Bromley, S.K., Iaboni, A., Davis, S.J., Whitty, A., Green, J.M., Shaw, A.S., Weiss, A., and Dustin, M.L. (2001). The immunological synapse and CD28-CD80 interactions. *Nat. Immunol.* 2, 1159-1166.
- Brossard, C., Feuillet, V., Schmitt, A., Randriamampita, C., Romao, M., Raposo, G., and Trautmann, A. (2005). Multifocal structure of the T cell - dendritic cell synapse. *Eur. J. Immunol.* 35, 1741-1753.
- Bunnell, S.C., Kapoor, V., Tribble, R.P., Zhang, W., and Samelson, L.E. (2001). Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity*. 14, 315-329.
- Clatza, A., Bonifaz, L.C., Vignali, D.A., and Moreno, J. (2003). CD40-induced aggregation of MHC class II and CD80 on the cell surface leads to an early enhancement in antigen presentation. *J. Immunol.* 171, 6478-6487.
- Combs, J., Kim, S.J., Tan, S., Ligon, L.A., Holzbaur, E.L., Kuhn, J., and Poenie, M. (2006). Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103, 14883-14888.
- Cooper, J.A. (1987). Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J. Cell Biol.* 105, 1473-1478.
- Crocker, P.R., Jefferies, W.A., Clark, S.J., Chung, L.P., and Gordon, S. (1987). Species heterogeneity in macrophage expression of the CD4 antigen. *J. Exp. Med.* 166, 613-618.
- Dague, E., Alsteens, D., Latge, J.P., and Dufrene, Y. (2007). High-resolution cell surface dynamics of germinating *Aspergillus fumigatus* conidia. *Biophys. J.*
- Degn, S.E., Thiel, S., and Jensenius, J.C. (2007). New perspectives on mannan-binding lectin-mediated complement activation. *Immunobiology* 212, 301-311.
- Delon, J., Bercovici, N., Raposo, G., Liblau, R., and Trautmann, A. (1998). Antigen-dependent and -independent Ca<sup>2+</sup> responses triggered in T cells by dendritic cells compared with B cells. *J. Exp. Med.* 188, 1473-1484.
- Desai, A. and Mitchison, T.J. (1997). Microtubule polymerization dynamics. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 83-117.
- Disanza, A., Steffen, A., Hertzog, M., Frittoli, E., Rottner, K., and Scita, G. (2005). Actin polymerization machinery: the finish line of signaling networks, the starting point of cellular movement. *Cell Mol. Life Sci.* 62, 955-970.
- Downing, K.H. and Nogales, E. (1998). Tubulin and microtubule structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 10, 16-22.
- Du Clos, T.W. and Mold, C. (2004). C-reactive protein: an activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity. *Immunol. Res.* 30, 261-277.

- Dustin,M.L. (2002). The immunological synapse. *Arthritis Res. 4 Suppl 3*, S119-S125.
- Dustin,M.L. (2007). Cell adhesion molecules and actin cytoskeleton at immune synapses and kinapses. *Curr. Opin. Cell Biol. 19*, 529-533.
- Dustin,M.L. and Springer,T.A. (1989). T-cell receptor cross-linking transiently stimulates adhesiveness through LFA-1. *Nature 341*, 619-624.
- Farrar,J.D., Smith,J.D., Murphy,T.L., Leung,S., Stark,G.R., and Murphy,K.M. (2000). Selective loss of type I interferon-induced STAT4 activation caused by a minisatellite insertion in mouse Stat2. *Nat. Immunol. 1*, 65-69.
- Finkelstein,L.D., Shimizu,Y., and Schwartzberg,P.L. (2005). Tec kinases regulate TCR-mediated recruitment of signaling molecules and integrin-dependent cell adhesion. *J. Immunol. 175*, 5923-5930.
- Fire,A., Xu,S., Montgomery,M.K., Kostas,S.A., Driver,S.E., and Mello,C.C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature 391*, 806-811.
- Franco,M., Peters,P.J., Boretto,J., van,D.E., Neri,A., Souza-Schorey,C., and Chavrier,P. (1999). EFA6, a sec7 domain-containing exchange factor for ARF6, coordinates membrane recycling and actin cytoskeleton organization. *EMBO J. 18*, 1480-1491.
- Frank,S.R., Hatfield,J.C., and Casanova,J.E. (1998). Remodeling of the actin cytoskeleton is coordinately regulated by protein kinase C and the ADP-ribosylation factor nucleotide exchange factor ARNO. *Mol. Biol. Cell 9*, 3133-3146.
- Friedl,P. and Brocker,E.B. (2000). T cell migration in three-dimensional extracellular matrix: guidance by polarity and sensations. *Dev. Immunol. 7*, 249-266.
- Friedl,P., den Boer,A.T., and Gunzer,M. (2005). Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol. 5*, 532-545.
- Gao,J.L. and Murphy,P.M. (1993). Species and subtype variants of the N-formyl peptide chemotactic receptor reveal multiple important functional domains. *J. Biol. Chem. 268*, 25395-25401.
- Geiger,C., Nagel,W., Boehm,T., van,K.Y., Figdor,C.G., Kremmer,E., Hogg,N., Zeitlmann,L., Dierks,H., Weber,K.S., and Kolanus,W. (2000). Cytohesin-1 regulates beta-2 integrin-mediated adhesion through both ARF-GEF function and interaction with LFA-1. *EMBO J. 19*, 2525-2536.
- Ginsberg,M.H., Partridge,A., and Shattil,S.J. (2005). Integrin regulation. *Curr. Opin. Cell Biol. 17*, 509-516.
- Goda,S., Quale,A.C., Woods,M.L., Felthausen,A., and Shimizu,Y. (2004). Control of TCR-mediated activation of beta 1 integrins by the ZAP-70 tyrosine kinase interdomain B region and the linker for activation of T cells adapter protein. *J. Immunol. 172*, 5379-5387.
- Goley,E.D. and Welch,M.D. (2006). The ARP2/3 complex: an actin nucleator comes of age. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 7*, 713-726.

- Graf, B., Bushnell, T., and Miller, J. (2007). LFA-1-mediated T cell costimulation through increased localization of TCR/class II complexes to the central supramolecular activation cluster and exclusion of CD45 from the immunological synapse. *J. Immunol.* **179**, 1616-1624.
- Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* **285**, 221-227.
- Green, C.E., Schaff, U.Y., Sarantos, M.R., Lum, A.F., Staunton, D.E., and Simon, S.I. (2006). Dynamic shifts in LFA-1 affinity regulate neutrophil rolling, arrest, and transmigration on inflamed endothelium. *Blood* **107**, 2101-2111.
- Greenwald, R.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2005). The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.* **23**, 515-548.
- Gudima, G.O., Vorobjev, I.A., and Chentsov, Y. (1988). Centriolar location during blood cell spreading and motion in vitro: an ultrastructural analysis. *J. Cell Sci.* **89** ( Pt 2), 225-241.
- Gunzer, M., Schafer, A., Borgmann, S., Grabbe, S., Zanker, K.S., Brocker, E.B., Kampgen, E., and Friedl, P. (2000). Antigen presentation in extracellular matrix: interactions of T cells with dendritic cells are dynamic, short lived, and sequential. *Immunity* **13**, 323-332.
- Gunzer, M., Weishaupt, C., Hillmer, A., Basoglu, Y., Friedl, P., Dittmar, K.E., Kolanus, W., Varga, G., and Grabbe, S. (2004). A spectrum of biophysical interaction modes between T cells and different antigen-presenting cells during priming in 3-D collagen and in vivo. *Blood* **104**, 2801-2809.
- Guo, S. and Kemphues, K.J. (1995). par-1, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611-620.
- Harrington, L.E., Mangan, P.R., and Weaver, C.T. (2006). Expanding the effector CD4 T-cell repertoire: the Th17 lineage. *Curr. Opin. Immunol.* **18**, 349-356.
- Henrickson, S.E. and von Andrian, U.H. (2007). Single-cell dynamics of T-cell priming. *Curr. Opin. Immunol.* **19**, 249-258.
- Hofer, S., Pfeil, K., Niederegger, H., Ebner, S., Nguyen, V.A., Kremmer, E., Auffinger, M., Neyer, S., Furhapter, C., and Heufler, C. (2006). Dendritic cells regulate T-cell deattachment through the integrin-interacting protein CYTIP. *Blood* **107**, 1003-1009.
- Hogquist, K.A., Jameson, S.C., and Bevan, M.J. (1995). Strong agonist ligands for the T cell receptor do not mediate positive selection of functional CD8+ T cells. *Immunity* **3**, 79-86.
- Holmes, K.C., Popp, D., Gebhard, W., and Kabsch, W. (1990). Atomic model of the actin filament. *Nature* **347**, 44-49.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* **299**, 1057-1061.

- Huppa, J.B. and Davis, M.M. (2003). T-cell-antigen recognition and the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 973-983.
- Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. (1992). Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176, 1693-1702.
- Janeway, C.A., Travers, A., and Walport M. (2002). *Immunologie*. Spektrum Verlag, 5. deutsche Auflage.
- Kabsch, W., Mannherz, H.G., Suck, D., Pai, E.F., and Holmes, K.C. (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347, 37-44.
- Kapetanovic, R. and Cavaillon, J.M. (2007). Early events in innate immunity in the recognition of microbial pathogens. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 7, 907-918.
- Katagiri, K., Maeda, A., Shimonaka, M., and Kinashi, T. (2003). RAPL, a Rap1-binding molecule that mediates Rap1-induced adhesion through spatial regulation of LFA-1. *Nat. Immunol.* 4, 741-748.
- Katagiri, K., Shimonaka, M., and Kinashi, T. (2004). Rap1-mediated lymphocyte function-associated antigen-1 activation by the T cell antigen receptor is dependent on phospholipase C-gamma1. *J. Biol. Chem.* 279, 11875-11881.
- Kelly, T.A., Jeanfavre, D.D., McNeil, D.W., Woska, J.R., Jr., Reilly, P.L., Mainolfi, E.A., Kishimoto, K.M., Nabozny, G.H., Zinter, R., Bormann, B.J., and Rothlein, R. (1999). Cutting edge: a small molecule antagonist of LFA-1-mediated cell adhesion. *J. Immunol.* 163, 5173-5177.
- Kessler, M. and Gaub, H.E. (2006). Unfolding barriers in bacteriorhodopsin probed from the cytoplasmic and the extracellular side by AFM. *Structure*. 14, 521-527.
- Kliche, S., Breitling, D., Togni, M., Pusch, R., Heuer, K., Wang, X., Freund, C., Kasirer-Friede, A., Menasche, G., Koretzky, G.A., and Schraven, B. (2006). The ADAP/SKAP55 signaling module regulates T-cell receptor-mediated integrin activation through plasma membrane targeting of Rap1. *Mol. Cell Biol.* 26, 7130-7144.
- Kliche, S., Nagel, W., Kremmer, E., Atzler, C., Ege, A., Knorr, T., Koszinowski, U., Kolanus, W., and Haas, J. (2001). Signaling by human herpesvirus 8 kaposin A through direct membrane recruitment of cytohesin-1. *Mol. Cell* 7, 833-843.
- Kolanus, W., Nagel, W., Schiller, B., Zeitlmann, L., Godar, S., Stockinger, H., and Seed, B. (1996). Alpha L beta 2 integrin/LFA-1 binding to ICAM-1 induced by cytohesin-1, a cytoplasmic regulatory molecule. *Cell* 86, 233-242.
- Krawczyk, C., Oliveira-dos-Santos, A., Sasaki, T., Griffiths, E., Ohashi, P.S., Snapper, S., Alt, F., and Penninger, J.M. (2002). Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity*. 16, 331-343.
- Kuhn, J.R. and Poenie, M. (2002). Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity*. 16, 111-121.

- Kuhne, M.R., Lin, J., Yablonski, D., Mollenauer, M.N., Ehrlich, L.I., Huppa, J., Davis, M.M., and Weiss, A. (2003). Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein-76 are required for TCR-induced microtubule-organizing center polarization. *J. Immunol.* **171**, 860-866.
- Kupfer, A. and Dennert, G. (1984). Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J. Immunol.* **133**, 2762-2766.
- Kupfer, A., Mosmann, T.R., and Kupfer, H. (1991). Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 775-779.
- Kupfer, A. and Singer, S.J. (1989). The specific interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. IV. Membrane and cytoskeletal reorganizations in the bound T cell as a function of antigen dose. *J. Exp. Med.* **170**, 1697-1713.
- Kupfer, A., Swain, S.L., and Singer, S.J. (1987). The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J. Exp. Med.* **165**, 1565-1580.
- Le, R.D., Lankar, D., Yuseff, M.I., Vascotto, F., Yokozeki, T., Faure-Andre, G., Mougneau, E., Glaichenhaus, N., Manoury, B., Bonnerot, C., and Lennon-Dumenil, A.M. (2007). Syk-dependent actin dynamics regulate endocytic trafficking and processing of antigens internalized through the B-cell receptor. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3451-3462.
- Lee, K.H., Dinner, A.R., Tu, C., Campi, G., Raychaudhuri, S., Varma, R., Sims, T.N., Burack, W.R., Wu, H., Wang, J., Kanagawa, O., Markiewicz, M., Allen, P.M., Dustin, M.L., Chakraborty, A.K., and Shaw, A.S. (2003). The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science* **302**, 1218-1222.
- Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* **295**, 1539-1542.
- Lowin-Kropf, B., Shapiro, V.S., and Weiss, A. (1998). Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J. Cell Biol.* **140**, 861-871.
- Luo, B.H., Carman, C.V., and Springer, T.A. (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu. Rev. Immunol.* **25**, 619-647.
- Mangan, P.R., Harrington, L.E., O'Quinn, D.B., Helms, W.S., Bullard, D.C., Elson, C.O., Hatton, R.D., Wahl, S.M., Schoeb, T.R., and Weaver, C.T. (2006). Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* **441**, 231-234.
- Martin-Cofreces, N.B., Sancho, D., Fernandez, E., Vicente-Manzanares, M., Gordon-Alonso, M., Montoya, M.C., Michel, F., Acuto, O., Alarcon, B., and Sanchez-Madrid, F. (2006). Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. *J. Immunol.* **176**, 4201-4207.
- Martinez, F.O., Sica, A., Mantovani, A., and Locati, M. (2008). Macrophage activation and polarization. *Front Biosci.* **13**, 453-461.

- May, R.C. (2001). The Arp2/3 complex: a central regulator of the actin cytoskeleton. *Cell Mol. Life Sci.* 58, 1607-1626.
- McCloskey, M.A. and Poo, M.M. (1986). Contact-induced redistribution of specific membrane components: local accumulation and development of adhesion. *J. Cell Biol.* 102, 2185-2196.
- Meacci, E., Tsai, S.C., Adamik, R., Moss, J., and Vaughan, M. (1997). Cytohesin-1, a cytosolic guanine nucleotide-exchange protein for ADP-ribosylation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 94, 1745-1748.
- Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
- Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
- Moritz, M., Braunfeld, M.B., Sedat, J.W., Alberts, B., and Agard, D.A. (1995). Microtubule nucleation by gamma-tubulin-containing rings in the centrosome. *Nature* 378, 638-640.
- Murphy, K.M., Heimberger, A.B., and Loh, D.Y. (1990). Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCR $\alpha$  thymocytes in vivo. *Science* 250, 1720-1723.
- Nagel, W., Zeitlmann, L., Schilcher, P., Geiger, C., Kolanus, J., and Kolanus, W. (1998). Phosphoinositide 3-OH kinase activates the beta2 integrin adhesion pathway and induces membrane recruitment of cytohesin-1. *J. Biol. Chem.* 273, 14853-14861.
- Nolz, J.C., Gomez, T.S., Zhu, P., Li, S., Medeiros, R.B., Shimizu, Y., Burkhardt, J.K., Freedman, B.D., and Billadeau, D.D. (2006). The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Curr. Biol.* 16, 24-34.
- Oakley, C.E. and Oakley, B.R. (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 338, 662-664.
- Olmsted, J.B. and Borisy, G.G. (1973). Microtubules. *Annu. Rev. Biochem.* 42, 507-540.
- Olson, T.S. and Ley, K. (2002). Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol* 283, R7-28.
- Pamir, E., George, M., Fertig, N., and Benoit, M. (2007). Planar patch-clamp force microscopy on living cells. *Ultramicroscopy*.
- Pantaloni, D., Le, C.C., and Carlier, M.F. (2001). Mechanism of actin-based motility. *Science* 292, 1502-1506.
- Pelling, A.E., Li, Y., Shi, W., and Gimzewski, J.K. (2005). Nanoscale visualization and characterization of *Myxococcus xanthus* cells with atomic force microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 6484-6489.

- Pentcheva-Hoang, T., Egen, J.G., Wojnoonski, K., and Allison, J.P. (2004). B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse. *Immunity*. 21, 401-413.
- Peters, J.D., Furlong, M.T., Asai, D.J., Harrison, M.L., and Geahlen, R.L. (1996). Syk, activated by cross-linking the B-cell antigen receptor, localizes to the cytosol where it interacts with and phosphorylates alpha-tubulin on tyrosine. *J. Biol. Chem.* 271, 4755-4762.
- Punnonen, J., Aversa, G., Cocks, B.G., McKenzie, A.N., Menon, S., Zurawski, G., de Waal, M.R., and de Vries, J.E. (1993). Interleukin 13 induces interleukin 4-independent IgG4 and IgE synthesis and CD23 expression by human B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90, 3730-3734.
- Purtic, B., Pitcher, L.A., van Oers, N.S., and Wulfig, C. (2005). T cell receptor (TCR) clustering in the immunological synapse integrates TCR and costimulatory signaling in selected T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102, 2904-2909.
- Quintana, A., Schwindling, C., Wenning, A.S., Becherer, U., Rettig, J., Schwarz, E.C., and Hoth, M. (2007). T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 104, 14418-14423.
- Ratner, S., Sherrod, W.S., and Lichlyter, D. (1997). Microtubule retraction into the uropod and its role in T cell polarization and motility. *J. Immunol.* 159, 1063-1067.
- Reichardt, P., Dornbach, B., Rong, S., Beissert, S., Gueler, F., Loser, K., and Gunzer, M. (2007). Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse. *Blood* 110, 1519-1529.
- Reichert, P., Reinhardt, R.L., Ingulli, E., and Jenkins, M.K. (2001). Cutting edge: in vivo identification of TCR redistribution and polarized IL-2 production by naive CD4 T cells. *J. Immunol.* 166, 4278-4281.
- Rief, M., Oesterhelt, F., Heymann, B., and Gaub, H.E. (1997). Single Molecule Force Spectroscopy on Polysaccharides by Atomic Force Microscopy. *Science* 275, 1295-1297.
- Robertson, J.M., Jensen, P.E., and Evavold, B.D. (2000). DO11.10 and OT-II T cells recognize a C-terminal ovalbumin 323-339 epitope. *J. Immunol.* 164, 4706-4712.
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J.V., and Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat. Cell Biol.* 1, 321-322.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* 155, 1151-1164.
- Samstag, Y., Eibert, S.M., Klemke, M., and Wabnitz, G.H. (2003). Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration. *J. Leukoc. Biol.* 73, 30-48.
- Semrich, M., Smith, A., Feterowski, C., Beer, S., Engelhardt, B., Busch, D.H., Bartsch, B., Laschinger, M., Hogg, N., Pfeffer, K., and Holzmann, B. (2005). Importance of integrin

LFA-1 deactivation for the generation of immune responses. *J. Exp. Med.* 201, 1987-1998.

Serrador,J.M., Cabrero,J.R., Sancho,D., Mittelbrunn,M., Urzainqui,A., and Sanchez-Madrid,F. (2004). HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity.* 20, 417-428.

Souza-Schorey,C., Boshans,R.L., McDonough,M., Stahl,P.D., and Van,A.L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* 16, 5445-5454.

Sterry,S.J., Kelly,J.M., Turner,S.J., and Carbone,F.R. (1995). T cell receptor V alpha bias can be determined by TCR-contact residues within an MHC-bound peptide. *Immunol. Cell Biol.* 73, 89-94.

Stinchcombe,J.C., Bossi,G., Booth,S., and Griffiths,G.M. (2001). The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity.* 15, 751-761.

Stinchcombe,J.C., Majorovits,E., Bossi,G., Fuller,S., and Griffiths,G.M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443, 462-465.

Stoll,S., Delon,J., Brotz,T.M., and Germain,R.N. (2002). Dynamic imaging of T cell-dendritic cell interactions in lymph nodes. *Science* 296, 1873-1876.

Stowers,L., Yelon,D., Berg,L.J., and Chant,J. (1995). Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 92, 5027-5031.

Suntharalingam,G., Perry,M.R., Ward,S., Brett,S.J., Castello-Cortes,A., Brunner,M.D., and Panoskaltsis,N. (2006). Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412. *N. Engl. J. Med.* 355, 1018-1028.

Taams,L.S., van,E.W., and Wauben,M.H. (1999). Antigen presentation by T cells versus professional antigen-presenting cells (APC): differential consequences for T cell activation and subsequent T cell-APC interactions. *Eur. J. Immunol.* 29, 1543-1550.

Takada,Y., Ye,X., and Simon,S. (2007). The integrins. *Genome Biol.* 8, 215.

Tang,P., Cheng,T.P., Agnello,D., Wu,C.Y., Hissong,B.D., Watford,W.T., Ahn,H.J., Galon,J., Moss,J., Vaughan,M., O'Shea,J.J., and Gadina,M. (2002). Cybr, a cytokine-inducible protein that binds cytohesin-1 and regulates its activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 2625-2629.

Taylor,P.R., Martinez-Pomares,L., Stacey,M., Lin,H.H., Brown,G.D., and Gordon,S. (2005). Macrophage receptors and immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 23, 901-944.

Tskvitaria-Fuller,I., Rozelle,A.L., Yin,H.L., and Wulfig,C. (2003). Regulation of sustained actin dynamics by the TCR and costimulation as a mechanism of receptor localization. *J. Immunol.* 171, 2287-2295.



- Varma,R., Campi,G., Yokosuka,T., Saito,T., and Dustin,M.L. (2006). T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster. *Immunity*. 25, 117-127.
- Vauti,F., Prochnow,B.R., Freese,E., Ramasamy,S.K., Ruiz,P., and Arnold,H.H. (2007). Arp3 is required during preimplantation development of the mouse embryo. *FEBS Lett*.
- Veldhoen,M., Hocking,R.J., Atkins,C.J., Locksley,R.M., and Stockinger,B. (2006). TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 24, 179-189.
- Venkateswarlu,K., Gunn-Moore,F., Tavaré,J.M., and Cullen,P.J. (1999). EGF-and NGF-stimulated translocation of cytohesin-1 to the plasma membrane of PC12 cells requires PI 3-kinase activation and a functional cytohesin-1 PH domain. *J. Cell Sci.* 112 ( Pt 12), 1957-1965.
- Vieira,P.L., Christensen,J.R., Minaee,S., O'Neill,E.J., Barrat,F.J., Boonstra,A., Barthlott,T., Stockinger,B., Wraith,D.C., and O'Garra,A. (2004). IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* 172, 5986-5993.
- Vyas,J.M., Kim,Y.M., rtavanis-Tsakonas,K., Love,J.C., Van,d., V, and Ploegh,H.L. (2007). Tubulation of class II MHC compartments is microtubule dependent and involves multiple endolysosomal membrane proteins in primary dendritic cells. *J. Immunol.* 178, 7199-7210.
- Watford,W.T., Li,D., Agnello,D., Durant,L., Yamaoka,K., Yao,Z.J., Ahn,H.J., Cheng,T.P., Hofmann,S.R., Cogliati,T., Chen,A., Hissong,B.D., Husa,M.R., Schwartzberg,P., O'Shea,J.J., and Gadina,M. (2006). Cytohesin binder and regulator (cybr) is not essential for T- and dendritic-cell activation and differentiation. *Mol. Cell Biol.* 26, 6623-6632.
- Weber,K.S., Weber,C., Ostermann,G., Dierks,H., Nagel,W., and Kolanus,W. (2001). Cytohesin-1 is a dynamic regulator of distinct LFA-1 functions in leukocyte arrest and transmigration triggered by chemokines. *Curr. Biol.* 11, 1969-1974.
- Wilczynski,J.R., Radwan,M., and Kalinka,J. (2008). The characterization and role of regulatory T cells in immune reactions. *Front Biosci.* 13, 2266-2274.
- Wojcikiewicz,E.P., Abdulreda,M.H., Zhang,X., and Moy,V.T. (2006). Force spectroscopy of LFA-1 and its ligands, ICAM-1 and ICAM-2. *Biomacromolecules*. 7, 3188-3195.
- Wojcikiewicz,E.P., Zhang,X., and Moy,V.T. (2004). Force and Compliance Measurements on Living Cells Using Atomic Force Microscopy (AFM). *Biol. Proced. Online*. 6, 1-9.
- Woods,M.L., Kivens,W.J., Adelman,M.A., Qiu,Y., August,A., and Shimizu,Y. (2001). A novel function for the Tec family tyrosine kinase Itk in activation of beta 1 integrins by the T-cell receptor. *EMBO J.* 20, 1232-1244.
- Wulfig,C., Sjaastad,M.D., and Davis,M.M. (1998). Visualizing the dynamics of T cell activation: intracellular adhesion molecule 1 migrates rapidly to the T cell/B cell

interface and acts to sustain calcium levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 6302-6307.

Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M.L., and Saito, T. (2005). Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat. Immunol.* 6, 1253-1262.

Zhang, X., Wojcikiewicz, E., and Moy, V.T. (2002). Force spectroscopy of the leukocyte function-associated antigen-1/intercellular adhesion molecule-1 interaction. *Biophys. J.* 83, 2270-2279.

Zlotnik, A. and Yoshie, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*. 12, 121-127.

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	anti
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
$\mu\text{l}$	Mikroliter
<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>Abp</b>	<i>actin-binding protein</i>
<b>ADAP</b>	<i>adhesion- and degranulation-adaptor protein</i>
<b>ADP</b>	Adenosin-Diphosphat
<b>AFM</b>	<i>atomic force microscopy</i>
<b>AMP</b>	Adenosin-Monophosphat
<b>APC</b>	Antigen präsentierende Zelle
<b>ARF</b>	<i>ADP ribosylation factor</i>
<b>ARP2/3</b>	<i>actin-related protein 2/3</i>
<b>Arpc</b>	<i>actin-related protein complex</i>
<b>ATP</b>	Adenosin-Triphosphat
<b>BCR</b>	B-Zellrezeptor
<b>BMDc</b>	<i>bone marrow dendritic cell</i>
<b>BSA</b>	<i>bovine serum albumine</i>
<b>CD</b>	<i>cluster of differentiation</i>
<b>CFSE</b>	Carboxylfluoreszein Diazetat, Succinimidyl Ester
<b>CM</b>	<i>complete medium</i>
<b>cSMAC</b>	<i>central SMAC</i>
<b>CTL</b>	<i>cytotoxic T lymphocyte</i>
<b>CTLA-4</b>	<i>cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
<b>CYTIP</b>	<i>Cytohesin interacting protein</i>
<b>DC</b>	Dendritische Zelle
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraazetat
<b>ERM</b>	Ezrin-Radixin-Myosin
<b>FACS</b>	<i>fluorescence activated cell scanner / sorter</i>
<b>FCS</b>	fötales Kälberserum
<b>Foxp3</b>	<i>forkhead box protein 3</i>
<b>GDP</b>	Guanin-Diphosphat
<b>GM-CSF</b>	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
<b>GTP</b>	Guanin-Triphosphat
<b>HDAC6</b>	<i>histone-deacetylase 6</i>
<b>h</b>	Stunde
<b>ICAM-1</b>	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunglobulin
<b>IL</b>	Interleukin
<b>IS</b>	Immunologische Synapse
<b>kDa</b>	<i>kilo Dalton</i>
<b>LAT</b>	<i>linker for the activation of T cells</i>
<b>Lck</b>	<i>lymphocyte specific kinase</i>
<b>LFA-1</b>	<i>leukocyte functional antigen-1</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid

<b>MACS</b>	<i>magnet cell sorting</i>
<b>MHC-Komplex</b>	Haupthistokompatibilitätskomplex
<b>mM</b>	Millimolar
<b>ms</b>	Millisekunde
<b>MTOC</b>	Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
<b>NEAA</b>	<i>non essential amino acids</i>
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
<b>NK-Zelle</b>	Natürliche Killerzelle
<b>NPF</b>	<i>nucleation-promoting factor</i>
<b>OVAp</b>	Ovalbumin-Peptid
<b>PBS</b>	<i>phosphate buffered saline</i>
<b>PFA</b>	Paraformaldehyd
<b>PH</b>	<i>pleckstrin homology</i>
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Phosphoinositol 2-Phosphat
<b>PIP<sub>3</sub></b>	Phosphoinositol 3-Phosphat
<b>PKC<math>\theta</math></b>	Proteinkinase C $\theta$
<b>PLC</b>	Phospholipase C
<b>pSMAC</b>	<i>peripheral SMAC</i>
<b>PVDF</b>	Polyvinylidenfluorid
<b>RAP1</b>	<i>repressor activator protein 1</i>
<b>RISC</b>	<i>RNA induced silencing complex</i>
<b>RNA</b>	Ribonukleotidsäure
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SCAR</b>	<i>suppressor of cyclic AMP repressor</i>
<b>SDS-PAGE</b>	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>SH2</b>	<i>Src-homology</i>
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>SKAP55</b>	<i>Src kinase-associated phosphoprotein of 55 kDa</i>
<b>SLP76</b>	<i>SH2 domain containing leukocyte protein of 76 kDa</i>
<b>SMAC</b>	<i>supramolecular activation cluster</i>
<b>Tab.</b>	Tabelle
<b>TBS</b>	<i>tris buffered saline</i>
<b>TCR</b>	T-Zellrezeptor
<b>Th-Zelle</b>	T-Helferzelle
<b>TIRF</b>	<i>Total internal reflection fluorescence</i>
<b>TLR</b>	<i>Toll-like receptor</i>
<b>TNF</b>	Tumor Nekrosefaktor
<b>ü.N.</b>	über Nacht
<b>V</b>	Volt
<b>VASP</b>	<i>Vasodialator stimulated phosphoprotein</i>
<b>WASP</b>	<i>Wiskott-Aldrich syndrome protein</i>
<b>WAVE</b>	<i>WASP-family verprolin-homologous protein</i>
<b>xg</b>	x-fache Gravitation
<b>ZAP-70</b>	<i>Zeta-chain associated protein of 70 kDa</i>

## Danksagung

Ich danke an erster Stelle dem Mentor dieser Arbeit, Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland, für die Betreuung des Promotionsverfahrens und die Übernahme des Hauptreferats. Ebenso danke ich Herrn Prof. Dr. Ralf R. Mendel für sein Interesse an dieser Arbeit und für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Matthias Gunzer, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand, für die Bereitstellung des interessanten Themas, seine großzügige Bereitstellung sämtlicher für diese Promotion benötigten Mittel und schließlich für die Übernahme des Korreferats. Außerdem danke ich unserem „*Betreuer des Jahres*“ für seine ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit und dafür, dass es möglich war, den Blick neben der Doktorarbeit auch auf andere Dinge richten zu können.

Für die Arbeit in ihren Laboren danke ich Prof. Dr. Waldemar Kolanus (LIMES-Institut, Bonn), Dr. Stefanie Kliche (Universität Magdeburg) und Prof. Dr. Hermann Gaub (LMU, München). Dr. Theresia „*Thres*“ Stradal danke ich für ihr, von mir oft in Anspruch genommenes, offenes Ohr und die unzähligen Ratschläge während der letzten drei Jahre. Danke auch an Dr. Martin „*Beno*“ Benoit für vier tolle Wochen in München.

Einen herzlichen Dank und Grüße nach Magdeburg allen Mitglieder der Arbeitsgruppe „Immundynamik“ für die letzten vier Jahre. Allen voran natürlich Mike „*The Hengst*“ Hasenberg („*Warum liegt hier eigentlich Stroh?*“) und Cindy „*unsere Perle des Ostens*“ Nitschke. Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Abteilung Zell- und Immunbiologie für die tolle Arbeitsatmosphäre und die kollektive Hilfsbereitschaft. Besonders danke ich Simone alias „*Frau Reinwald*“ alias „*Foxy Lu*“ alias „*Die Schnitzelmama*“ („*Du bist die einzig wahre Dancing Queen! Du bist Deutschland!*“), Tanja alias „*Frau Bo*“ („*Ich habe übrigens immer noch Deine „Tanas-Mix“ CD...*“) und Yusuf alias „*Yuff*“ („*Smaluch shaddyim!*“) für alles, was nicht mit der Arbeit zu tun hatte. Und außerdem nicht zu vergessen: Anja alias „*Ajne*“ („*Hoi Kleine!*“) und das „*Nicölsche*“ – Einfach nur „Danke für alles!“

Schließlich danke ich allen Freunden, die hier namentlich zu erwähnen den Rahmen sprengen würde, die aber dennoch alle ihren Teil dazu beigetragen haben, diese Arbeit zu überstehen und das Leben lebenswert zu machen.

Meiner Familie gilt besonderer Dank. Ihr fester Glaube an meine Fähigkeiten hat mich immer begleitet, ohne sie wäre dies alles nicht möglich gewesen!

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten

Name: Bastian Dornbach  
Geburtsdatum: 01.08.1979  
Geburtsort: Goslar  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Familienstand: ledig  
Anschrift: Pestalozzistr. 8, 38114 Braunschweig

### Schulausbildung

1986 – 1990 Grundschole am Fredenberg, Salzgitter  
1990 – 1992 Orientierungsstufe am Fredenberg, Salzgitter  
1992 – 1999 Gymnasium am Fredenberg, Salzgitter

### Studium

10.1999 – 10.2004 Studium „Diplom-Biologie“ an der Technischen Universität  
Carolo-Wilhemina zu Braunschweig  
01.2004 – 10.2004 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe „Immundynamik“,  
Gesellschaft für Biotechnologische Forschung,  
Braunschweig  
Thema: „Funktion der JAM-Proteine in der Immunolo-  
gischen Synapse und Vergleich der Immunologischen  
Synapsen zwischen T-Zellen und verschiedenen  
antigenpräsentierenden Zellen“  
01.2005 – 12.2007 Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe „Immundynamik“,  
Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung, Braunschweig  
Thema: „Vergleich der Interaktion von naiven T-Zellen mit  
verschiedenen antigenpräsentierenden Zellen und die  
Rolle von CYTIP bei antigenspezifischen Kontakten in  
Dendritischen Zellen“